

**KORRELATION ZWISCHEN TRANSPLANTAT-GEGEN-WIRT-REAKTION
(GVHD) NACH ALLOGENER BLUTSTAMMZELLTRANSPLANTATION
UND ZIRKULIERENDEN EPCAM-POSITIVEN ZELLEN**

DISSERTATION

**zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)**

seit 1558

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Sara Hilber
geboren am 25.11.1983 in Plauen

Jena, am 20. September 2010

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. Katharina Pachmann
2. Prof. Dr. med. James Beck
3. Prof. Dr. med. Hans-Jochem Kolb

Tag der öffentlichen Verteidigung: 06.09.2011

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
min	Minuten
U/min	Umdrehungen pro Minute
Abb.	Abbildung
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
APC	Antigen präsentierende Zelle (antigen presenting cell)
BOOP	Bronchiolitis obliterans mit organisierender Pneumonie
bzw.	beziehungsweise
CD	Cluster of Differentiation
CK	Cytokeratin
CML	chronische myeloische Leukämie
CMV	Zytomegalievirus
CR	komplette Remission (complete remission)
CSA	Cyclosporin A
DLI	Donor Lymphozyten Infusion
DC	Dendritische Zellen
d.h.	das heißt
ECP	Extracorporale Photopherese
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
EMT	epithelial-mesenchymal transition
EpCAM	Epithelial Cell Adhesion Molecule
ERCP	Endoskopisch retrograde Cholangio-Pankreatikographie
FcR	Fc- Rezeptor
FESS	functional endoscopic sinus surgery
FSU	Friedrich-Schiller-Universität
FK506	Tacrolimus
G-CSF	Granulozytenkolonie-stimulierender Faktor (granulocyte-colony stimulating factor)
Ggf.	Gegebenen Falles
GIT	Gastrointestinaltrakt
GvHD	Transplantat gegen Wirt Reaktion (Graft-versus-Host Disease)
GvL	Transplantat gegen Leukämie Effekt (Graft-versus-Leukaemia)

HEA-FITC	Human Epithelial Antigen- Fluoresceinthiocyanat
HLA	humanes Leukozytenantigen (Human Leukozyte Antigen)
HSCT	hämatopoetische Stammzelltransplantation (hematopoietic stem cell transplantation)
HSV	Herpes Zoster Virus
IL	Interleukin
KOF	Körperoberfläche
LSC	Laser Scanning Zytometrie
mg/dl	Milligramm je Deziliter
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (Major Histocompatibility Complex)
MMF	Mycofenolat Mofetil
NF-κ-B	Nuklearer Faktor-κ-B
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PSL	Prednisolon
Tab.	Tabelle
TCR	T-Zell Rezeptor (T-cell receptor)
Th-1/ 2	T-Helferzellen 1/ 2
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TREG	regulatorische T-Zellen
z.B.	zum Beispiel

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	- 1 -
INHALTSVERZEICHNIS	- 3 -
1 ZUSAMMENFASSUNG.....	- 5 -
2 EINLEITUNG.....	- 6 -
2.1 Hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSCT)	- 6 -
2.1.1 Ablauf der HSCT	- 6 -
2.1.1.1 Stammzellgewinnung	- 7 -
2.1.1.2 Bedeutung der HLA-Merkmale	- 7 -
2.1.1.3 Stellenwert der HSCT am Beispiel der ALL, AML, CML und des Myelomes	- 8 -
2.1.1.4 Immunologische Rekonstitution nach SZT	- 9 -
2.1.2 Graft-versus-Host Disease (GvHD)	- 10 -
2.1.2.1 Akute GvHD	- 11 -
2.1.2.2 Chronische GvHD	- 13 -
2.1.2.3 GvHD-Prophylaxe- und -Therapiemöglichkeiten.....	- 14 -
2.1.3 Graft versus Leukaemia Effekt (GvL)	- 17 -
2.2 EpCAM	- 18 -
2.2.1 Die Funktion von EpCAM	- 18 -
2.2.2 Das Expressionsmuster von EpCAM	- 20 -
2.2.2.1 EpCAM in gesunden Geweben	- 20 -
2.2.2.2 EpCAM bei malignen Erkrankungen	- 21 -
2.2.2.3 EpCAM bei Entzündung	- 23 -
3 ZIEL DIESER ARBEIT.....	- 24 -
4 MATERIAL UND METHODIK	- 25 -
4.1 Patientenauswahl.....	- 25 -
4.2 Materialien	- 25 -
4.2.1 Geräte	- 25 -
4.2.2 Verbrauchsmaterialien	- 25 -
4.2.3 Antikörper und Chemikalien	- 25 -
4.2.4 Patientientenproben	- 26 -
4.3 Methoden	- 26 -
4.3.1 Nachweis der EpCAM-positiven Zellen	- 26 -

4.3.2	Nachweis der EpCAM-positiven Zellen	- 27 -
5	ERGEBNISSE	- 30 -
5.1	Nachweis EpCAM-positiver Zellen im zirkulierenden Blut.....	- 30 -
5.2	Medianer Zellverlauf.....	- 30 -
5.3	Korrelation von EpCAM-positiven Zellen und GvHD	- 32 -
5.3.1	Akute GvHD	- 32 -
5.3.2	Chronische GvHD	- 33 -
5.4	Korrelation EpCAM-positiver Zellen und medikamentöse Immunsuppression der chronischen GvHD	- 34 -
5.5	Korrelationen von Krankheitsentität und Zellzahlverlauf der EpCAM-positiven Zellen	- 35 -
5.5.1	Verläufe bei der ALL	- 37 -
5.5.2	Zellverläufe bei der AML	- 38 -
5.5.3	Verläufe beim Multiplen Myelom (Myelom)	- 40 -
5.5.4	Verläufe bei der CML	- 42 -
6	DISKUSSION.....	- 48 -
6.1	Nachweis EpCAM-positiver Zellen im zirkulierenden Blut.....	- 48 -
6.2	Verlauf der Zellzahlmediane.....	- 50 -
6.3	Korrelation von EpCAM-positiven Zellen und GvHD	- 50 -
6.3.1	EpCAM als Antigen auf Epithelzellen.....	- 51 -
6.3.2	EpCAM als Antigen auf hämatopoetischen Zellen.....	- 54 -
6.4	Korrelation EpCAM-positiver Zellen und medikamentöse Immunsuppression der chronischen GvHD	- 57 -
6.5	Korrelationen von Krankheitsentität und Zellzahlverlauf der EpCAM-positiven Zellen	- 58 -
6.5.1	Verläufe bei der ALL	- 58 -
6.5.2	Verläufe bei der AML	- 59 -
6.5.3	Verläufe beim Myelom	- 60 -
6.5.4	Verläufe bei der CML	- 61 -
7	SCHLUSSFOLGERUNG.....	- 62 -
8	LITERATURVERZEICHNIS	- 63 -
9	ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS.....	- 73 -
10	ANHANG	- 74 -

1 ZUSAMMENFASSUNG

Die allogene Blutstammzelltransplantation (HSCT) ist ein potenziell kuratives Therapieverfahren bei malignen hämatologischen Erkrankungen. Eine zum Teil schwer behandelbare Nebenwirkung der allogenen HSCT ist die Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion (Graft-versus-Host Disease, GvHD). Die Pathomechanismen der GvHD sind nur teilweise verstanden.

Das Epitheliale Zelladhäsionsmolekül (EpCAM) ist ein Epithelzellmarker, welches Funktionen bei der Zelladhäsion, -migration und -differenzierung, -proliferation, dem Zellzyklus und -metabolismus, der Morphogenese, der Geweberegeneration sowie der Metastasierung übernimmt. Im gesunden Organismus sind EpCAM-positive Zellen nicht im peripheren Blut nachweisbar. Besondere Bedeutung haben zirkulierende EpCAM-positive Zellen als Marker für die Diagnose und zum Therapie-Monitoring von verschiedenen Karzinomen wie Kolon- und Mammakarzinom. Auf diesen Karzinomzellen wird EpCAM über- oder *de novo*-exprimiert. Weiterhin existieren Publikationen, die über eine aberrante EpCAM-Expression auf Plasmazellen berichten. Daneben konnten bei einzelnen Patienten mit entzündlichen Erkrankungen zirkulierende EpCAM-positive Zellen im Blut nachgewiesen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 35 Patienten nach allogener HSCT auf das Vorhandensein von im peripheren Blut zirkulierenden EpCAM-positiven Zellen untersucht. Hierzu wurden Verlaufsmessungen über einen Zeitraum von bis zu vier Jahren durchgeführt. Die Anzahl der EpCAM-positiven Zellen pro ml Blut wurde mittels Laser Scanning Cytometer (LSC) bestimmt. In der Krankenakte wurden bestimmte klinische Ereignisse, wie die Entwicklung der GvHD, entzündliche Prozesse, Operationen, immunsuppressive Therapie und andere Auffälligkeiten verfolgt, um diese dann mit dem zeitlichen Auftreten und dem quantitativen Verlauf der EpCAM-positiven Zellen korrelieren zu können.

Die hier gewonnenen Daten zeigen erstmalig, dass bei Patienten nach allogener HSCT mit einer Latenz von drei bis neun Monaten regelmäßig EpCAM-positive Zellen nachgewiesen werden können. Ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer akuten GvHD und EpCAM-positiver Zellen konnte nicht nachgewiesen werden. Im Falle des Auftretens einer chronischen GvHD wurden jedoch regelmäßig EpCAM-positive Zellen im Verlauf nachgewiesen, wobei sich die Zellzahlen indirekt proportional zum Schweregrad der GvHD verhalten. Des Weiteren können entzündliche Prozesse sowie operative Eingriffe den Verlauf der EpCAM-positiven Zellzahlen modulieren. Aus unseren Untersuchungen schließen wir, dass zirkulierende EpCAM-positive Zellen nicht zwingend Tumorzellen entsprechen müssen. Normale EpCAM-positive Zellen können durchaus in der Blutzirkulation existieren, ohne unverzüglich vom Immunsystem erfasst und zerstört zu werden. Dabei gibt es durchaus Anhaltspunkte, dass EpCAM zum einen auf Epithelzellen, aber auch auf hämatopoetischen Zellen exprimiert werden könnte.

2 EINLEITUNG

2.1 Hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSCT)

In den letzten 20 Jahren hat sich die Transplantation von Knochenmark und Blutstammzellen zu einem Standardtherapieverfahren für zahlreiche Erkrankungen, insbesondere für die Behandlung hämatologischer Neoplasien, entwickelt. In vielen Fällen stellt sie die bisher einzige kurative Therapiemöglichkeit dar.

2.1.1 Ablauf der HSCT

Grundsätzlich kann man zwei Formen der HSCT unterscheiden:

- autologe HSCT (Transplantation von körpereigenen, hämatopoetischen Stammzellen)
- allogene HSCT (nicht körpereigene hämatopoetische Stammzellen von verwandten (Familien-) oder nicht verwandten (Fremd-) Spendern)

Während bei der autologen HSCT das therapeutische Prinzip eine myeloablative Chemotherapie darstellt, bei der die maligne Erkrankung eradiziert wird und die Hämatopoese durch die Retransfusion der eigenen Blutstammzellen rekonstituiert wird, wird bei der allogenen HSCT das eigene kranke lymphohämatopoetische Mark gegen ein gesundes ersetzt (Einsele und Kanz 1999, Tabbara et al. 2002). Der entscheidende Therapieeffekt bei allogener HSCT ist eine immunologische Aktivität gegen die Grunderkrankung. Das neue Immunsystem wird aus den fremden hämatopoetischen Stammzellen gebildet. Dieses Immunsystem erkennt residuelle maligne Zellen, aber auch körpereigene Gewebe wie Haut, Darm und Leber als fremd. Diese Effekte bezeichnet man als Graft-versus-Leukaemia (GvL) und Graft-versus-Host Disease (GvHD). Durch den GvL-Effekt ist es möglich, die vorgeschaltete Konditionierungstherapie bei allogener HSCT nicht vollständig myeloablativ und damit weniger toxisch zu gestalten.

2.1.1.1 Stammzellgewinnung

Die hämatopoetischen Stammzellen werden anhand des CD34-Moleküls charakterisiert. Zurzeit kann das Stammzelltransplantat aus drei Quellen gewonnen werden:

- aus dem Knochenmark nach mehrmaliger Aspiration aus dem Beckenkamm
- aus dem peripheren Blut über Leukapherese nach Stimulation und Mobilisation der Stammzellen aus dem Knochenmark mittels Chemotherapie und/oder Granulozyten-koloniestimulierendem Faktor (G-CSF)
- aus dem Nabelschnurblut Neugeborener, welches anschließend kryokonserviert werden muss.

Inzwischen werden Stammzellen am häufigsten mittels peripherer Gefäßpunktion und folgender Leukapherese gewonnen (Karrer 2003).

2.1.1.2 Bedeutung der HLA-Merkmale

Jeder Mensch besitzt ein individuelles Muster an Oberflächenmolekülen, das primär für die Abstoßung unterschiedlicher Gewebe nach Transplantationen verantwortlich ist. Diese Moleküle bezeichnet man als Human Leukocyte Antigen (HLA). Für das adaptive Immunsystem spielen zwei Klassen eine Rolle: HLA-I (HLA-A, -B, -Cw), das praktisch auf allen kernhaltigen Zellen zu finden ist und HLA-II (HLA-DR, -DQ, -DP), welches nur auf antigenpräsentierenden Zellen (APC) vertreten ist. Genetisch gehören beide Klassen zum Major Histocompatibility Complex (MHC) und sind auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 lokalisiert (Kröger und Zander 2004). Der Polymorphismus des HLA-Systems stellt die Transplantationsmedizin vor eine große Herausforderung. Soll ein allogenes Transplantat eingesetzt werden, strebt man eine möglichst vollständige Übereinstimmung der HLA-A-, -B-, -DR, und -DQ- Allele (mit jeweils zwei Allelen) von Spender und Empfänger an. Dies ist von besonderer Bedeutung, um das Risiko der GvHD möglichst gering zu halten (Hurley et al. 1999). Doch kommt es bei 30-50% der HLA-identischen Geschwisterstammzelltransplantationen trotzdem zu dieser Reaktion. Als Auslöser werden neben Inkompatibilitäten der anderen Genloci, besonders so genannte HLA-minor-Antigene, verantwortlich gemacht. Ein Beispiel für diese Tatsache ist, dass bei weiblichen Spenderinnen mit männlichem Empfänger das Risiko für die Entstehung einer GvHD doppelt so hoch ist. Dabei spielen Y-Chromosom-assoziierte-minor-Antigene eine bedeutende Rolle (Goulmy et al. 1996).

2.1.1.3 Stellenwert der HSCT am Beispiel der ALL, AML, CML und des Myelomes

Die *akute lymphatische Leukämie (ALL)* ist bedingt durch eine maligne Entartung von T- oder B-Lymphozyten in unterschiedlichen Stadien der Ausreifung. Die Heilungsrate mit Standardchemotherapie bei neu diagnostizierter ALL liegt nur bei 35-40% der Erwachsenen (Kröger und Zander 2004). Bei ungünstigen prognostischen Parametern (z.B. Philadelphia-Chromosom, Prä-B-ALL, B-Precursor-ALL, erreichen einer kompletten hämatologischen Remission (CR) später als 4 Wochen nach Therapiebeginn, initiale Leukozytenzahl größer 30.000/ μ l) wird bereits in der ersten CR die allogene HSCT angestrebt. Ansonsten gilt im Falle eines Rezidives der ALL die HSCT in der zweiten CR als Therapie der Wahl. Somit kann eine Heilung bei 30% erreicht werden (Einsele und Kanz 1999).

Die *akute myeloische Leukämie (AML)* ist eine maligne Erkrankung der Myelopoese, also der Bildung von Granulozyten und Monozyten. Der Stellenwert der allogenen HSCT hängt wesentlich vom Ergebnis der Chemotherapie ab. Sie wird in erster CR empfohlen, falls ein Familienspender vorliegt. Auch bei der zweiten CR steht die allogene HSCT zur Wahl. Bei Hochrisikopatienten werden in einigen Zentren HSCT mit unverwandten Spendern angestrebt. Eine Heilung kann in 10-50% der Fälle erreicht werden (Einsele und Kanz 1999). Die *chronisch myeloische Leukämie (CML)* gehört zu den chronisch myeloproliferativen Erkrankungen. Dabei kommt es zu einer bösartigen Vermehrung von Granulozytenvorstufen. Die allogene HSCT stellt auch weiterhin die einzige kurative Therapie der CML dar. Allerdings zeigte sich mit Einführung der Tyrosinkinase-Inhibitoren wie Imatinib ein starker Rückgang der Indikationsstellung zur allogenen HSCT. Sie wird Patienten angeraten, welche auf eine Behandlung mit Tyrosinkinase-Inhibitoren refraktär sind oder rezidivieren, ein hohes Risikoprofil hinsichtlich einer Krankheitsprogression aufweisen bzw. in akzelerierter Phase oder Blastenkrise diagnostiziert werden, sofern ein passender Spender zur Verfügung steht. Die Erfolgchancen sind mit bis zu 15% bei Transplantation während der Blastenkrise, bis 40% während der akzelerierten Phase und bis zu 80% während der chronischen Phase angegeben (Einsele und Kanz 1999).

Das *Multiple Myelom* (nachfolgend Myelom) ist charakterisiert durch eine maligne Vermehrung von Plasmazellen mit monoklonaler Gammopathie. Auch für das Myelom stellt die allogene HSCT die derzeit einzige kurative Therapieoption dar. Wegen der hohen therapiebedingten Mortalität ist die allogene HSCT (im Gegensatz zur autologen HSCT) kein Standardverfahren im Therapiekonzept des Myeloms und wird nur in Hochrisikokonstellationen bei jungen Patienten allgemein empfohlen. Daneben existiert ein hohes Rezidivrisiko, sodass nur 20-30% der Patienten ein langes krankheitsfreies Überleben erreichen (Kröger und Zander 2004).

2.1.1.4 Immunologische Rekonstitution nach SZT

Mit vollständig oder teilweise myeloablativer Konditionierungstherapie werden (1) maligne Zellen eliminiert, (2) das Immunsystem unterdrückt, sodass die fremden Zellen akzeptiert werden, und es wird (3) Platz für die sich neu entwickelten Zellen geschaffen. Diese drei Komponenten sind die Voraussetzungen einer erfolgreichen Transplantation. Die anschließende Rekonstitution eines gesunden lymphohämatopoetischen Organs ist Ziel dieser Prozedur. Mit steigender Immunsuppression, GvHD, Infektionen und verminderter Thymusfunktion verlangsamt sich jedoch die hämatopoetische und immunologische Rekonstitution.

Die Granulozytenzahl erreicht üblicherweise schon drei bis vier Wochen nach HSCT den Normalwert (Sosa et al. 1980). Empfängermakrophagen sind nach drei Monaten durch Spendermakrophagen ersetzt (Thomas et al. 1976). NK-Zellen (Natürliche Killerzellen), die zum angeborenen Immunsystem gehören, erreichen als erste der Lymphozyten nach einem Monat den Normalwert (Pavletic et al. 1998). Der Normwert der B-Lymphozyten ist nach sechs bis zwölf Monaten erreicht (Lum 1987). Die gesamten T-Lymphozyten erreichen den Normalwert erst nach einem Jahr und später. Dabei verläuft die Rekonstitution der CD8⁺- (Suppressor- oder Killerzellen) schneller als die der CD4⁺-(Helferzellen, Th1 und 2) T-Lymphozyten (Pavletic et al. 1998). CD8⁺- sowie Memory-CD4⁺-T-Lymphozyten werden thymusunabhängig, naive CD4⁺-T-Lymphozyten dagegen thymusabhängig rekonstituiert (Mackall et al. 1993). Lymphozytenvorläufer wandern dafür vom Knochenmark in den Thymus. Diese Thymozyten (Prä-T-Lymphozyten) reifen dann zu T-Lymphozyten mit ihren spezifischen Oberflächenrezeptoren für MHC-Moleküle. Dabei kontrollieren die Thymusepithelzellen unter engem Kontakt zu den T-Zellen deren Differenzierung und Selektion. Störungen der Epithelstruktur ziehen Störungen in der T-Lymphozytenreifung nach sich (Krenger und Holländer 2008). Tab. 1 fasst den zeitlichen Verlauf der Rekonstitution noch einmal zusammen.

Zelltyp	Rekonstitution
Granulozyten	3-4 Wochen
Makophagen	3 Monate
NK-Zellen	1-3 Monate
CD4 ⁺ -T-Lymphozyten (Helferzellen)	6-24 Monate
CD8 ⁺ -T-Lymphozyten (Suppressorzellen)	6-10 Monate
B-Lymphozyten	6-12 Monate

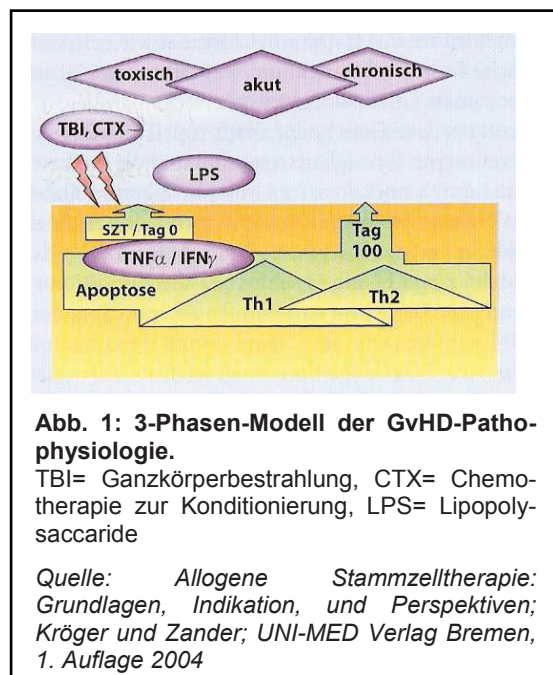
Tab. 1: Zeitlicher Verlauf der immunologischen Rekonstitution nach allogener HSCT.

2.1.2 Graft-versus-Host Disease (GvHD)

GvHD ist die häufigste und eine der bedeutendsten Komplikation nach HSCT. Sie ist mit einem sehr hohen Morbiditäts- wie auch Mortalitätsrisiko behaftet und limitiert den Einsatz der HSCT (Ferrara und Reddy 2006). Akute GvHD, definitionsgemäß bis zum 100. Tag nach HSCT, tritt bei 35-70% der Patienten nach allogener HSCT auf (Jakobson und Vogelsang 2007). 20-80% sind dann nach 100 Tagen von einer chronischen GvHD betroffen (Lee 2005, Sun et al. 2007).

GvHD resultiert aus der T-Zell-Aktivierung durch HLA-Moleküle. Billingham formulierte drei Voraussetzungen, die für die GvHD nötig sind. Zum einen benötigt das Transplantat immunologische Kompetenz in Form von reifen T-Zellen. Als zweites muss der Empfänger Antigene präsentieren, die von dem Spender als fremd erkannt werden. Und zum dritten darf der Empfänger keine suffiziente Immunantwort geben können (Billingham 1966). Dieses Modell wurde zu einem mehrstufigen Modell aus Gewebeschädigung, Antigenexpression, Zytokinproduktion und T-Zellaktivierung (so genannter *Zytokinsturm*) ausgeweitet (Antin und Ferrara 1992, Hess et al. 1992). Dieses Prinzip wird anhand des 3-Phasen-Modelles verdeutlicht (Ferrara und Deeg 1991, Abb. 1). Zudem werden neben T-Zellen auch NK-Zellen als GvHD-Effektoren betrachtet (Kröger und Zander 2004).

Konditionierung führt einerseits zu direkter apoptotischer Epithelzellschädigung mit Mukositis, aber auch zu einer Aktivierung von Makrophagen und APC. APC spielen eine herausragende Rolle bei der akuten GvHD. Sie präsentieren HLA und sind so für die Spender-Zellaktivierung verantwortlich (Teshima et al. 2002). Hinzu kommen verstärkende Effekte wie bakterielle Toxine (LPS) und mikrovaskuläre Schäden, die ebenfalls zu einem Epithelzelluntergang führen. Werden nun in diese Umgebung Stammzellen und immunkompetente Zellen transplantiert, so ist bei entsprechender Differenz der HLA-minor- und -major-Antigene eine verstärkte Aktivierung und Expansion der empfängerreaktiven T-Zellen möglich, die schließlich in einer akuten GvHD enden. Zur chronischen GvHD kommt es dann zum einen, wenn durch Autoantigene, die von Spender-APC präsentiert werden, neu gebildete Lymphozyten des Transplantats aktiviert werden, und zum anderen durch einen Shift der persistierenden Empfänger-reaktiven T-Zellen vom Th1-Typ zum Th2-Typ mit hyperproliferativer Reaktion (Ferrara und Deeg 1991).



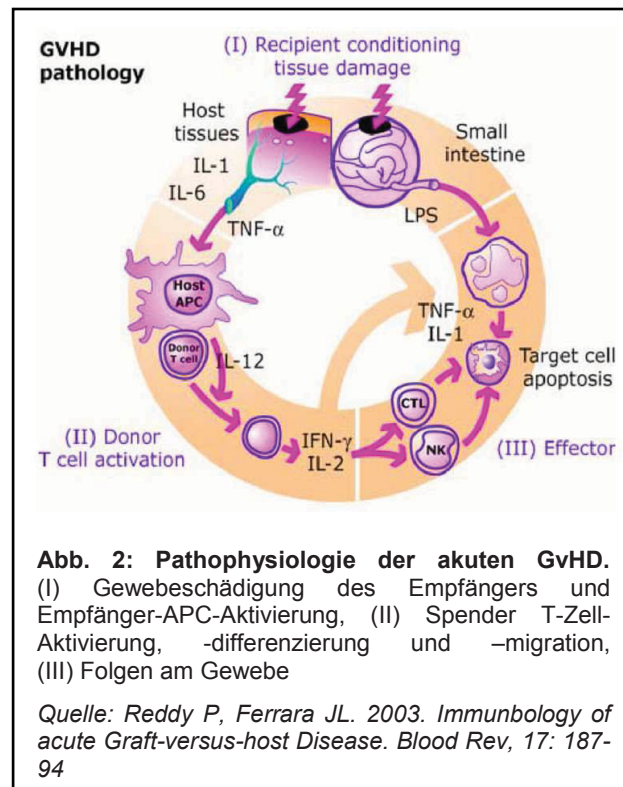
Daraus lässt sich schlussfolgern, dass Zielorgane der GvHD prinzipiell alle Organe sind, die lymphoide Zellen sowie epitheliale Strukturen enthalten. Akute und chronische GvHD unterscheiden sich dabei nicht nur im klinischen Krankheitsbild, sondern auch in den immunologischen Mechanismen.

2.1.2.1 Akute GvHD

Pathophysiologisch handelt es sich bei der akuten GvHD um eine Immunreaktion des Spenders gegen histoinkompatible, meist epitheliale Oberflächenantigene des Empfängers (Kröger und Zander 2004). Das alleinige Erkennen von Empfängerpeptiden löst noch keine Alloreaktivität aus. Zusätzlich muss das HLA-Molekül auf den APC des Empfängers von den Spender-T-Zell-Rezeptoren (TCR) der $CD4^+$ -T-Zellen erkannt werden (Zinkernagel und Doherty 1979). Die Pathogenese kann in drei Phasen eingeteilt werden: (1) Aktivierung von APC durch Konditionierung, (2) Spender T-Zell-Aktivierung, -differenzierung und -migration und (3) Folgen am Gewebe (Antin und Ferrara 1992, Reddy und Ferrara 2003).

Gewebeschäden durch die Konditionierung, die Grunderkrankung und Endotoxine führen zu vermehrter Produktion von Zytokinen wie $TNF-\alpha$, IL-1 und IL-6, sowie zu vermehrter Expression von HLA auf APC. Unter diesen Bedingungen ist es $CD4^+$ -T-Zellen möglich, im nächsten Schritt diese HLA-Moleküle mit Antigenen zu erkennen, unter Zytokinstimulation zu proliferieren und sich in Richtung Th1-Zellen zu differenzieren. Die reifen T-Zellen produzieren ebenfalls Zytokine wie IL-2, $TNF-\alpha$ und $IFN-\gamma$, welche in der Lage sind, NK-Zellen und zytotoxische T-Zellen (CTL, $CD8^+$) zu aktivieren. Durch die Zytokine dieser

verschiedenen Zellen kommt es letztendlich zur Apoptose im Gewebe (Antin und Ferrara et al 1992, Sun et al. 2007, Abb. 2).



Klinisch manifestiert sich die akute GvHD neben dem blutbildenden Organ, an Haut, Gastrointestinaltrakt (GIT) und Leber. Die häufigste klinische Manifestation ist ein juckender makulopapulöser Hautausschlag, der sich bis zum generalisierten Erythem mit Bullae, Desquamationen bis hin zur Nekrolyse entwickeln kann (Johnson und Farmer 1998). Die Hauptsymptome bei Befall des GIT sind Krämpfe und Diarrhoe, ebenso Übelkeit/Erbrechen, paralytischer Ileus und voluminöse, blutige Stühle. Die Diagnose sollte, wenn möglich, durch eine endoskopische Biopsie gesichert werden (Strasser et al. 1999). Leber-GvHD tritt meist in Kombination mit einer Hautmanifestation auf. Es zeigt sich ein Ikterus mit Hyperbilirubinämie und ansteigender alkalischen Phosphatase (Strasser et al. 1999). Bezieht die akute GvHD das hämatolymphatische System ein, kann dies im zirkulierenden Blut wie auch in Lymphknoten eine abnorme Relation von $CD4^+$ / $CD8^+$ -Zellen nach sich ziehen (Sale et al. 1992). Damit werden auch häufigere und schwerwiegendere Infektionen beobachtet.

Die Ausprägung der Organschädigung spiegelt sich direkt im Schweregrad der akuten GvHD wider. So lässt sich mittels gradueller Einteilung der akuten GvHD Aussagen über Prognose und klinischen Verlauf machen (Tab. 2). Dabei kann jedes der drei Hauptorgansysteme (Haut, GIT, Leber) einzeln bewertet werden. Wichtiger jedoch ist der Gesamtschweregrad I-IV° nach Glucksberg (Glucksberg et al. 1974, Prze piorka et al. 1995).

Stadium	Haut (Exanthem)	Leber (Bilirubin)	GIT (Stuhlmenge)
0	kein Exanthem	<2 mg/ dl	<500 ml/ Tag
1	Bis 25% der KOF	2-3 mg/ dl	500-1000 ml/ Tag
2	25-50% der KOF	3-6 mg/ dl	1000-1500 ml/ Tag
3	>50% der KOF	6-15 mg/ dl	>1500 ml/ Tag
4	Hautablösung, Blasenbildung	>15 mg/dl	zusätzlich Koliken, Ileus, Blutungen
Grad			
I (leicht)	Stadium 1-2	Stadium 0	Stadium 0
II (mäßig)	Stadium 1-3	Stadium 1	Stadium 1
III (schwer)	Stadium 2-3	Stadium 2-3	Stadium 2-3
IV (lebensbedrohlich)	Stadium 2-4	Stadium 2-4	Stadium 2-4

Tab. 2: Stadien- und Gradeinteilung der akuten GvHD nach Glucksberg (Glucksberg et al. 1974).

2.1.2.2 Chronische GvHD

Die Immunreaktion der chronischen GvHD richtet sich gegen epitheliales und mesenchymales Gewebe (Kröger und Zander 2004). Allgemein kann man sie als multisystemische allo- und autoimmune Krankheit mit immuner Dysregulation, Immundefizienz und geschädigter Organfunktion bezeichnen (Baird und Pavletic 2006). Die genaue Pathogenese ist hingegen weiterhin unklar. Spezifische T-Zell-Populationen, die Interaktion mit B-Zellen und die Rolle von Zytokinen werden dabei geprüft. Regulatorische T-Zellen (TREG) sind für die Selbst-Toleranz wichtig, und spielen bei autoimmunen Prozessen wie der chronischen GvHD eine Rolle. Sie sollen im Rahmen der chronischen GvHD einen protektiven Effekt haben (Rezvani et al. 2006). Autoreaktive T-Zellen, die sich hauptsächlich gegen HLA-minor-Antigene richten, werden für einige allo- und autoimmune Prozesse verantwortlich gemacht, die durch Fehler bei der Selektion im Thymus entstehen (Lee et al. 2003). Die Thymusreife scheint also eine Stellung in der Pathogenese zu haben, und somit auch die thymusabhängige T-Zell-Rekonstruktion (Vogelsang 2001). Das Zytokinmuster bei der chronischen GvHD entspricht dabei dem der Th2-Lymphozyten (Sherer und Shoenfeld 1998). Daneben scheinen B-Zellen und deren Antikörperproduktion von Bedeutung zu sein. Studien zufolge korreliert vermehrte Antikörperproduktion mit dem Schweregrad der chronischen GvHD (Patriarca et al. 2006).

Bevorzugte Zielorgane der chronischen GvHD sind das hämatopoetische System, die Haut, der Mund, die Leber und die Augen. Darüber hinaus kann man Symptome am GIT, der Lunge und den Gelenken beobachten. Allgemein kann sich die chronische GvHD in zwei Ausprägungen präsentieren. Zum einen als ein eher inflammatorisches, akutes Bild mit Erythem, Mukositis, Diarrhoe und Bronchiolitis obliterans mit organisierter Pneumonie (BOOP) und zum anderen als eine fibrotische, chronische Form mit sklerotischer oder lichenoider Hautveränderung sowie Ösophagusstrikturen (Baird und Pavletic 2006).

Aufgrund irreversibler Schäden der Tränendrüsen kommt es zu einer Keratokonjunktivitis sicca (Franklin et al. 1983). Die Symptome der Mundschleimhaut reichen analog vom Erythem, Leukoplakien, lichenoiden Läsionen über Ulzera, Atrophie und Xerostomie. Eine Cholestase weist auf einen Befall der Leber hin (Ratanatharathorn et al. 2001). Eine Lungenbeteiligung wird klinisch an der spät auftretenden BOOP deutlich (Epler 1988). Durch die Bindegewebszerstörung und autoimmune Prozesse kommt es bei Einbezug des blutbildenden Systems zu Zytopenien. Das Immundefizit und das damit verbundene Infektionsrisiko ist die Haupttodesursache der chronischen GvHD. Dabei spielen die gestörte Mukosabarriere, die immunsuppressive Therapie und die reduzierte Lymphozytenzahl eine Rolle (Maury et al. 2001).

Anhand der Ausdehnung der chronischen GvHD, unterscheidet man nach der Seattle-Klassifikation eine limitierte von einer extensiven chronischen GvHD (Shulman et al. 1980, Tab. 3). Dabei ist die Prognose der Patienten hinsichtlich der Rezidivfreiheit von der malignen Grunderkrankung bei limitierter chronischer GvHD besser als ohne chronische GvHD, da so der GvL-Effekt zum Tragen kommen kann.

Limited	-lokalisierte Hautbeteiligung <i>und/oder</i> Leberdysfunktion
Extensive	-generalisierte Hautbeteiligung <i>oder</i> -lokalisierte Hautbeteiligung <i>und/oder</i> Leberdysfunktion plus min. eines der folgenden Zeichen - Leberhistologie: chronisch progressive Hepatitis, Brückennekrosen oder Zirrhose - Augenbeteiligung - Beteiligung der Speicheldrüsen oder der Mukosa - jede andere Organbeteiligung

Tab. 3: Kriterien der Seattle-Klassifikation für die Einteilung der chronischen GvHD in limited und extensive (Shulman et al. 1980)

Trotz der klinischen Einteilung nach Glucksberg und der Seattle-Klassifikation, ist die Suche nach einem biochemischen, messbaren Marker der GvHD Gegenstand aktueller Forschungen. Ziel dieser Forschungen ist es, einen Marker zu finden, der eine Korrelation zu Aktivität und Therapie der GvHD zeigt, um ein diagnostisches sowie therapeutisches Monitoring zu ermöglichen.

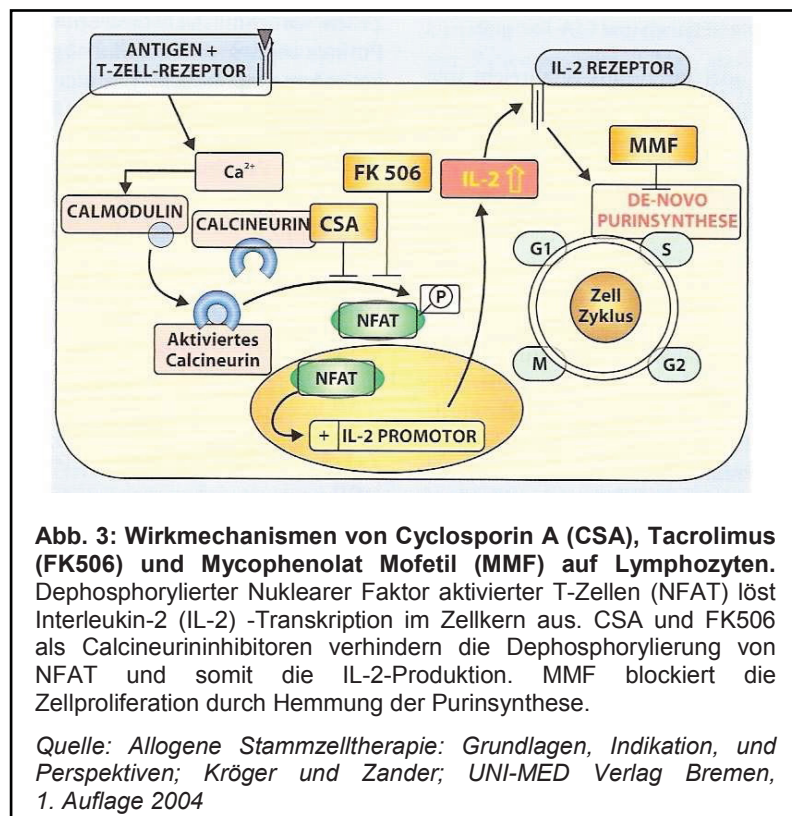
2.1.2.3 GvHD-Prophylaxe- und -Therapiemöglichkeiten

Für Komplikationen nach HSCT werden im Wesentlichen vier Faktoren verantwortlich gemacht, die es therapeutisch zu beherrschen gilt: die Grunderkrankung, die Konditionierung, die Knochenmarksinsuffizienz und die GvHD. Obwohl es möglich ist, Patienten zu heilen, ist eine resultierende transplantationsassoziierte Letalität von bis zu 30% zu erwarten (Karrer 2003). Ein wesentlicher Faktor für die hohe transplantations-

assoziierte Letalität ist die immunologische Hauptreaktion, die GvHD. Durch Optimierung von Spender-Empfänger-Faktoren (HLA-Kompatibilität, Alter, Geschlecht, Stammzellprodukt, Keimmilieu) ist man bemüht, das Risiko des Auftretens einer schweren GvHD zu reduzieren. Außerdem kommen zur pharmakologischen Prophylaxe der GvHD eine Vielzahl von Medikamenten zum Einsatz, deren Hauptfunktion es sein soll T-Zellen oder die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine zu schwächen.

Methotrexat, ein Folsäureantagonist, und Kortikosteroide werden als *unspezifische Immunsuppressiva* angesehen. Ihnen wird ein lymphotoxischer Effekt, sowie die Fähigkeit proinflammatorische Zytokine zu unterdrücken nachgesagt. Der genaue Wirkmechanismus ist allerdings noch unbekannt (Kröger und Zander 2004).

Über die direkte *Hemmung der T-Zellfunktion* wirken Cyclosporin A (CSA), Tacrolimus (FK506) und Mycophenolat Mofetil (MMF). CSA und FK506 gehören in die Gruppe der Calcineurin-Inhibitoren. Calcineurin-Inaktivierung führt über die Hemmung der Dephosphorylierung von „Nuklearer Faktor aktivierter T-Zellen“ (NFAT) letztlich zur Hemmung der IL-2-Gen-Transkription. IL-2 wird so in seiner Produktion gehemmt und letztlich die T-Zell-Aktivierung verhindert (Abb. 3). MMF entfaltet seine Wirkung über die Hemmung der Inosin-Monophosphat-Dehydrogenase, dem Schlüsselenzym der *de novo*-Purinsynthese, auf die Lymphozyten mehr als andere Zellen angewiesen sind (Abb. 3). Neben der immunsuppressiven Wirkung hat MMF antimikrobielle, -mykotische, -virale und -neoplastische Eigenschaften.



Zytokinantagonisten, wie Infliximab als ein TNF- α -Blocker, konnten bisher keinen Nutzen in der GvHD-Prophylaxe erbringen, werden aber erfolgreich bei therapierefraktärer GvHD eingesetzt. (Couriel et al. 2004).

Antizelluläre Antikörper entfalten ihre lymphotoxische Wirkung komplementvermittelt. Dabei handelt es sich um Immunglobuline, die gegen verschiedene Epitope von Immunzellen gerichtet sind. Sie können auch zur T-Zelldepletion angewandt werden.

Bei der T-Zelldepletion, als weitere Möglichkeit der GvHD-Prophylaxe bzw. -Therapie, sollen die GvHD verursachenden T-Zellen des Spenders eliminiert werden. Allerdings werden auch T-Zellen eliminiert, die den gewünschten GvL-Effekt verursachen und die nötig sind, um ein Anwachsen des Transplantates (Engraftment) zu ermöglichen (Ho et al. 2001). Der Einsatz dieser Methode muss somit kritisch abgewogen werden. Forschungsschwerpunkte liegen daher darin, speziell die T-Lymphozyten zu eliminieren, welche die GvHD auslösen und jene zu erhalten, die für den GvL-Effekt und das Engraftment verantwortlich sind.

Zur Therapie der chronischen GvHD kommt zusätzlich die *Extrakorporale Photopherese* (ECP), ein Verfahren der Lymphozyteninaktivierung mittels ultravioletten Lichts, zum Einsatz. Bei der ECP wird leukozytenreiches Plasma separiert, gefolgt von ex-vivo Gabe eines Photosensitizers und UV-Bestrahlung (5-10% der Gesamtlmphozyten), um anschließend dieses Plasma zu reinfundieren. Im Vordergrund steht dabei eine immunmodulatorische Wirkung. Apoptose von Lymphozyten, die sich über 72 Stunden nach ECP vollzieht, kann ebenfalls nachgewiesen werden. Das apoptotische Material löst über immunmodulatorische Vorgänge bei unbestrahlten T-Zellen im Blutkreislauf eine Anergie oder Suppression aus (www.derma-net-online.com/buch/kapitel17_3/Kap_17_3_5.pdf, 10.02.2009).

Die *akute GvHD* stellt einen wesentlichen Risikofaktor für die Entwicklung einer chronischen GvHD dar, weshalb deren Prävention eine wichtige Bedeutung zukommt. Zur Prophylaxe einer akuten GvHD konnte gezeigt werden, dass eine Kombinationstherapie von Methotrexat und CSA einer Monotherapie überlegen ist. Dabei wird Methotrexat an Tagen 1, 3, 6 und 11 intravenös injiziert, während CSA mindestens über drei Monate verabreicht wird (Storb et al. 1986). Therapeutisch, bei Auftreten einer akuten GvHD, sind unter Fortführung der Basisimmunsuppression im ausreichend hohen Spiegel immer noch Kortikosteroide die 1. Wahl (Ruutu et al. 1998). Als Zweitlinientherapie stehen zusätzlich Mycophenolat Mofetil (MMF, CellCept) bzw. dessen neueres Derivat Mycophenolsäure, Zytokinantagonisten wie Infliximab sowie die T-Zelldepletion mit antizellulären Antikörpern zur Wahl (Mitsuyasu et al. 1986; Chao et al. 1993; Ho et al. 2001; Couriel et al. 2004).

Standard- und Primärtherapie der *chronischen GvHD* ist die Kombination von CSA und Steroiden (Sullivan et al. 1981). Bleibt diese Kombination ohne Erfolg, können Verfahren der

UV-Inaktivierung, MMF oder Thalidomid eingesetzt werden (Scarlsbrick et al. 2008, Vogelsang 2008, Koc et al. 2000).

2.1.3 Graft versus Leukaemia Effekt (GvL)

Interessanterweise erleiden Patienten mit GvHD seltener ein Rezidiv ihrer Grunderkrankung als Patienten ohne GvHD (Horowitz et al. 1990). Dieser Effekt wird als Graft versus Leukaemia (GvL) oder allgemein als Graft versus Malignancy (GvM) bezeichnet. Damit eröffnen sich Wege der therapeutischen Nutzbarkeit. So werden z.B. bewusst nicht HLA-identische Spender gewählt, um eine leichte GvHD und damit auch den GvL-Effekt zu induzieren. Des Weiteren bietet sich unter Ausnutzung des GvL-Effektes die Möglichkeit, nicht myeloablative Konditionierungsstrategien mit geringerer Toxizität einzusetzen, um die HSCT breiter z.B. bei älteren Patienten anwenden zu können (Einsele und Kanz 1999). Der GvL-Effekt kommt darüber hinaus durch die therapeutische Spenderlymphozytenabgabe (DLI) gegen ein Rezidiv der Grunderkrankung deutlich zum Tragen. Damit kann sogar eine dauerhafte Remission erreicht werden. Die gleichzeitige Gefahr, durch die DLI eine GvHD auszulösen oder zu verstärken, muss dabei dem Nutzen gegenübergestellt und abgewogen werden (Kolb et al. 1990).

Dabei stellt sich die Frage, ob diese beiden Effekte auch getrennt auftreten können. Es gibt Hinweise, dass es sich bei den auslösenden Lymphozyten der GvHD um andere Subpopulationen handelt, als diejenigen, welche den GvL-Effekt vermitteln. Jedoch gibt es weiterhin auf der Ebene der Effektorzellen Unklarheiten über die Rolle der T-Lymphozytenpopulationen ($CD4^+$, $CD8^+$). Eine zytotoxische Wirkung gegen maligne Blutzellen konnte für beide T-Zelltypen nachgewiesen werden (Kolb 2008). Zum anderen spielen NK-Zellen eine wichtige Rolle (Farag et al. 2002).

Die Bestrebungen, GvHD zu therapieren ohne den GvL-Effekt zu beeinträchtigen, sind enorm und stellen eine große Herausforderung auf dem Feld der HSCT dar. Ein relativ einfacher Ansatz besteht in der Depletion bestimmter lymphozytärer Subpopulationen aus dem DLI-Präparat. Entfernt man beispielsweise $CD8^+$ -Zellen aus dem DLI-Präparat, reduziert sich die GvHD, ohne den GvL-Effekt zu beeinflussen (Giralt et al. 1995). Doch stellt dies nur bedingt zufrieden, da nicht $CD8^+$ -Zellen allein Effektoren der GvHD sind. Ideal wären spezielle Marker auf den Lymphozyten, die zu einer GvHD führten, aber nicht auf den Zellen des GvL-Effektes zu finden wären, um diese dann gezielt eliminieren zu können.

2.2 EpCAM

Wie oben angeführt, richtet sich die GvHD gegen epitheliales und mesenchymales Gewebe (Kröger und Zander 2004), wobei EpCAM auf den epithelialen Zellen in unterschiedlichen Mengen exprimiert wird.

Das epitheliale Zelladhäsionsmolekül EpCAM ist ein Ca^{2+} -unabhängiges, transmembranäres Glykoprotein (Litvinov et al. 1994). Es wurde bereits 1979 durch Verwendung monoklonaler Antikörper auf der Oberfläche kolorektaler Karzinomzellen identifiziert (Herlyn et al. 1979, Koprowski et al. 1979). EpCAM wurde unabhängig von verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht. Daher existieren viele Synonyme, z.B. 17-1A, HEA 125, MK-1, GA733-2, EGP-2, EGP-34, KSA, TROP-1, TACST-1, ESA, und KS1/4. 2007 wurde auf dem EpCAM-Symposium eine einheitliche Nomenklatur auf „EpCAM“ und „CD326“ festgelegt. Das TROP-1-Protein ist dem EpCAM sehr ähnlich, hat aber unterschiedliche Funktionen. Die Genbezeichnung wurde auf TACSTD-1 festgelegt (Baeuerle und Gires 2007).

EpCAM ist an der basolateralen Membran einfacher Epithelien vertreten. Die Expression kann sich durch entzündliche oder maligne Prozesse im Sinne einer über- oder *de novo*-Expression ändern. In Karzinomen kann EpCAM durch differentielle Glykosylierungen in verschiedenen Größen detektiert werden (32, 40 und 42 kDa) (Litvinov et al. 1994). Ob es Unterschiede in den drei Formen gibt, ist noch unbekannt.

2.2.1 Die Funktion von EpCAM

Eine der ersten beschriebenen Funktion von EpCAM ist die Vermittlung homophiler Adhäsion (Litvinov et al. 1994, Abb. 4(1)). Zum einen wurde EpCAM an der Oberfläche von interagierenden Zellen, wie z.B. auf intestinale Epithel und intestinalen Lymphozyten, nachgewiesen (Litvinov et al. 1994, Nochi et al. 2004). Zum anderen führt die EpCAM-Expression in murinen L-Zellen, die normalerweise keine interzelluläre Adhäsion aufweisen, zur Bildung von Zellaggregaten (Litvinov et al. 1997). Neben homophiler Zelladhäsion kann EpCAM mit Claudin-7, einem Tight Junction- Protein, interagieren (Ladwein et al. 2005, Abb. 4 (2)). Allerdings sind diese Adhäsionen im Vergleich zu klassischen Adhäsionsmolekülen wie den Cadherinen verhältnismäßig schwach, wobei eine Überexpression an EpCAM zur Reduktion der Cadherin-vermittelten Adhäsion führt. Die Menge an Cadherin bleibt dabei erhalten, jedoch vermindert sich die Assoziation von Cadherin zum Zytoskelett. Es sind jedoch noch nicht alle Bindungspartner bekannt, die für diese Interaktion nötig sind (Litvinov et al. 1997, Balzar et al. 1998,

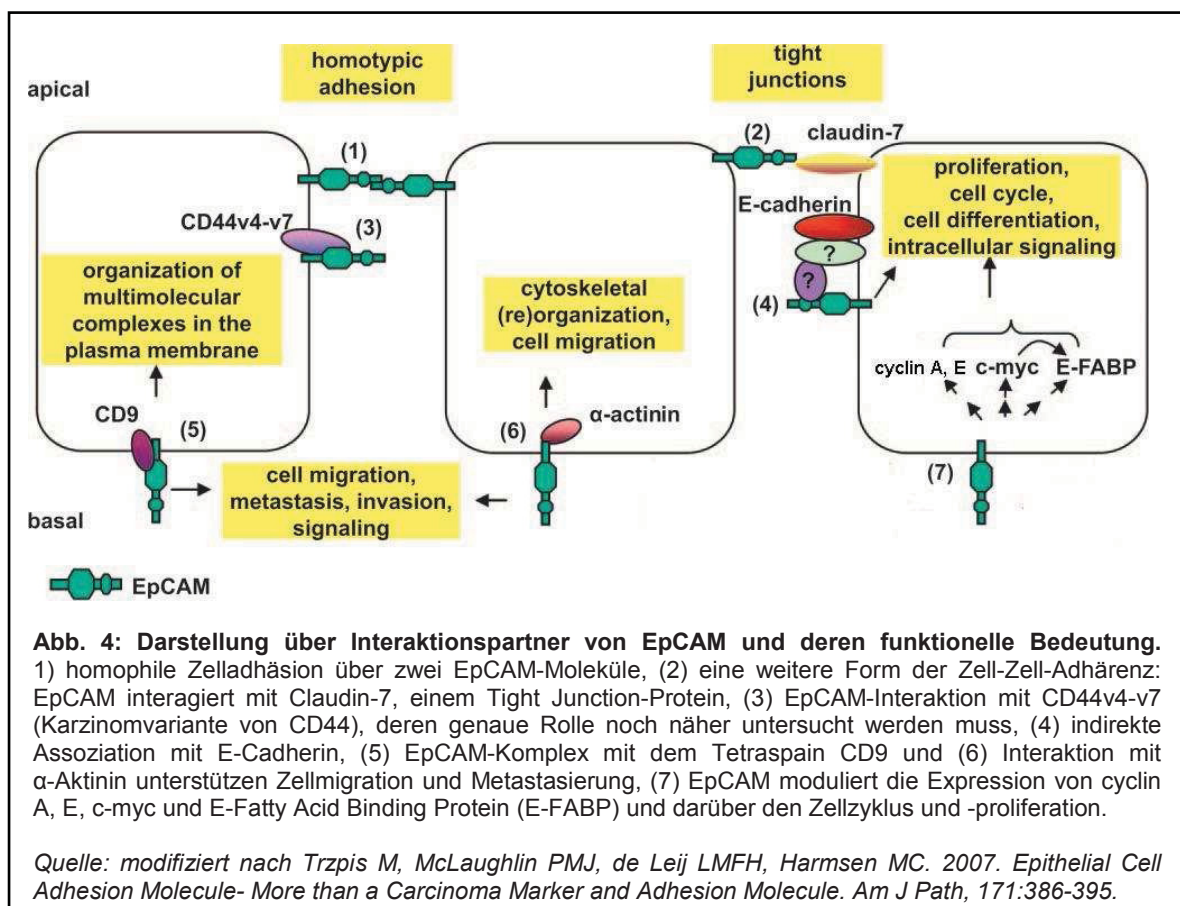
Abb. 4 (4)). Auf diese Art und Weise löst EpCAM die festeren Zell-Zell-Adhäsionen und moduliert Zellproliferation, -migration, -differenzierung und Gewebeerhalt (Winter et al. 2003b, Osta et al. 2006). Der Einfluss von EpCAM auf Proliferation und Migration wurde

durch funktionelle Analysen untermauert. Eine Hemmung der EpCAM-Expression in Brust- und Hypopharynxkrebszellen führte zur Reduktion der Zellproliferation und -migration (Osta et al. 2006).

In weiteren Untersuchungen zur Funktion von EpCAM konnte gezeigt werden, dass EpCAM im Rahmen der Zellzyklusregulation eine gesteigerte Expression von Cyclin A und E sowie des c-myc Targets E-Fatty Acid Binding Protein (E-FABP) zur Folge hat und somit zu einer gesteigerten Zellproliferation führt (Münz et al. 2004, Abb. 4 (7)).

Auf der zytoplasmatischen Seite agiert EpCAM unter anderem mit dem Aktin-Zytoskelett, dem Tetraspain CD9 und CD44v4-v7 (Balzar et al. 1998, Schmidt et al. 2004, Le Naour et al. 2006,

Abb. 4 (3), (5) und (6)). Diese Bindungspartner können besonders Zellmigration und somit Metastasierung unterstützen.



Zusammenfassend kann man sagen, dass EpCAM über die Interaktion mit seinen verschiedenen Bindungspartnern besonders bei Zell-Zell-Adhäsion, -migration, -differentierung, -proliferation, -metabolismus, -morphogenese und -zyklus von Bedeutung ist (Münz et al. 2004, Trzpis et al. 2007, Shiah et al. 2008, Mätzel et al. 2009). Diese

Vorgänge sind essenziell für die Karzinogenese, aber auch für Heilungsprozesse nach Zellschädigung.

2.2.2 Das Expressionsmuster von EpCAM

2.2.2.1 EpCAM in gesunden Geweben

Bereits während der *Embryogenese* wird EpCAM auf Zellen verschiedenster Gewebe, wie Lunge, Leber, Pankreas, Milchdrüsen, Haut und auf Keimzellen exprimiert. Die Expression weist einen zeitabhängigen Verlauf auf. Meist verlieren die Zellen EpCAM mit steigender Differenzierung. Im primären Lungen- und Bronchialepithel kommt es in der frühen Entwicklung (7.-8. Woche) zu einer starken EpCAM-Expression, während die adulte Lunge nur auf dem Alveolarepithel und den Bronchialzellen EpCAM exprimiert (Kasper et al. 1995). Hepatozyten sind bei einem 8 Wochen alten Embryo EpCAM-positiv und verlieren diese Expression mit fortschreitender Differenzierung. Lediglich die Zellen der Gallengänge behalten EpCAM. Interessanterweise zeigen regenerierende Hepatozyten wieder eine EpCAM-Expression. EpCAM zählt zu den Stammzellenmarkern auf Hepatozyten (Jozefczuk et al. 2009). Auf Pankreaszellen bleibt EpCAM im Verlauf nur auf duktalem und Inselzellen erhalten (Moldenhauer et al. 1987, Cirulli et al. 1998). Die postnatale Entwicklung der Brustdrüsen korreliert ebenfalls mit der EpCAM-Expression auf deren Zellen. Wenn die Milchproduktion einsetzt, ist das Epithel ausdifferenziert und die EpCAM-Expression nimmt deutlich ab (Balzar et al. 2001). Auch Keratinozyten und Melanozyten der Haut sind erst ausdifferenziert EpCAM-negativ (Klein et al. 1987). Anderson et al. beschreiben die zeitlich begrenzte EpCAM-Expression der Keimzellen während der frühen Gonadenentwicklung (Anderson et al. 1999). Der Verlust der EpCAM-Expression korreliert dabei mit dem Verlust der Stammzellpotenz (Stingl et al. 2001). EpCAM-positive Stammzellen konnten auch im Endometrium nachgewiesen werden (Gargett et al. 2009). Dieser Sachverhalt deutet darauf hin, dass Gewebedifferenzierung und -spezialisierung in Zusammenhang mit der EpCAM-Expression sind (Trzpis et al. 2007). Dabei wurde EpCAM auch in Stammzellen gefunden, die nicht epithelialen Ursprungs waren.

In *adulten Geweben* wird EpCAM an der basolateralen Membran von gesunden, einfachen Epithelien, vor allem im Drüsengewebe, Pseudo-Plattenepithel und Übergangsepithel exprimiert. Gesundes, reifes Plattenepithel, sowie mesenchymale, muskuläre, und neuro-endokrine Gewebe sind EpCAM-negativ (Moldenhauer et al. 1987). Die Expressionsstärke variiert zwischen den Geweben.

Die Drüsen des endokrinen Systems (Schilddrüse, Hypophyse, adrenale Drüsen) sowie die Brustdrüsen sind EpCAM-positiv. In der Haut ist EpCAM nur auf Zellen der Schweißdrüsen und der proliferativen Zone der Haarfollikel vertreten. Die Zellen des männlichen und weiblichen Genitaltraktes (Ovarien, Zervix, Uterus, Testis, Prostata) exprimieren

unterschiedlich stark EpCAM. In der Niere lässt sich EpCAM auf den Tubuluszellen nachweisen. Im GIT weist das Kolonepithel die stärkste EpCAM-Expression auf, im Magen ist EpCAM nur schwach nachweisbar und im Dünndarm intermediär. Dabei lässt sich EpCAM, wie auch im Haarfollikel, nur in der basalen, proliferativen Zellschicht, also dort, wo sich Stammzellen für die apikale Zellerneuerung befinden, nachweisen (Schichl et al. 1986). Im Thymus lässt sich EpCAM im Mark und in den Hassel-Körperchen, nicht aber in der Rinde nachweisen (Moldenhauer et al. 1987).

EpCAM konnte jedoch auch auf Zellen nicht-epithelialen Ursprungs nachgewiesen werden. Der Nachweis von EpCAM erfolgte in murinen Plasmazellen, Myelomen und B-Lymphomen sowie bei einigen humanen Myelomen und T-Zell-Linien, nicht aber auf B-Lymphozyten (Bergsagel et al. 1992). In Bezug auf das EpCAM-positive gastrointestinale Epithel kam man zu dem Schluss, dass EpCAM für drei Funktionen im GIT in Frage kommen kann: (1) Entweder für den IgA-Transport durch das intestinale Epithel, (2) als Vermittler zum Durchtritt von Plasmazellen oder (3) als Verankerung von Plasmazellen im Epithel (Bergsagel et al. 1992). Nelson et al. untersuchten EpCAM im Thymus von Mäusen genauer. Sie wiesen EpCAM im pränatalen Thymus, auf unreifen Thymozyten ($CD4^-CD8^-$, $CD4^+CD8^+$), auf Thymusepithel des Markes und auf dendritischen Zellen nach und postulierten, dass EpCAM bei der Thymozytenreifung oder bei der T-Lymphozytenwanderung und -funktion involviert ist (Nelson et al. 1996). Darüber hinaus konnten EpCAM, E-Cadherin und MUC-1, alle drei als maligne Marker bekannt, auch in unreifen hämatopoetischen Stammzellen nachgewiesen werden. EpCAM ist sogar ein sehr selektiver Marker für unreife Erythroblasten. Gleichzeitig wurde bei diesen Zellen CD34 und CD105 auf der Zelloberfläche nachgewiesen, und wird somit in Zusammenhang mit der frühen Erythropoese gebracht. Die Rolle der Adhäsionsmoleküle ist nicht bekannt. Antikörper gegen EpCAM riefen keine inhibitorischen Effekte hervor (Lammers et al. 2002).

Festzuhalten ist, dass EpCAM keinen exklusiv epithelialen Marker darstellt.

2.2.2.2 *EpCAM bei malignen Erkrankungen*

Benigne und maligne Proliferation ist bei vielen Geweben mit einer über- oder *de novo*-EpCAM-Expression assoziiert (Litvinov et al. 1996, Breuhahn et al. 2006). Kein EpCAM findet sich bei Tumoren nicht-epithelialen Ursprungs wie Sarkomen, Melanomen, Lymphomen oder myeloischen Leukämien (Moldenhauer et al. 1987, Went et al. 2004). Einige Autoren schließen daraus, dass EpCAM als streng epithelialer Marker zu sehen sei (Moldenhauer et al. 1987, Chaubal et al. 1999). Dem ist jedoch eine Arbeit von Bergsagel et al. entgegen zu halten, in der EpCAM unter anderem auf murinen und humanen Plasmazellen und auf Myelomzellen nachgewiesen werden konnte. Angesichts der verschiedenen Expression auf

B-Zell-Linien könnte man EpCAM auch als Marker zur Phänotypisierung von Lymphozyten- und Plasmazellneoplasien nutzen, da EpCAM nur in den voll ausgereiften Malignomen, nicht aber in Malignomen der frühen Reifungsstufen der Lymphozyten exprimiert wird (Bergsagel et al. 1992).

Bei Karzinomen der Kopf-Hals Region wird EpCAM *de novo*- exprimiert (High et al. 1996). Von Ösophagus- bis Kolonkarzinomen wird EpCAM *über*exprimiert (Moldenhauer et al. 1987). Zudem wurde beschrieben, dass die EpCAM-Proteinmenge mit verstärkter Proliferation und Abnahme der Differenzierung von intestinalen Zellen korreliert (Schiechl et al. 1986). Somit befindet sich EpCAM bereits bei Metaplasien vermehrt und wird von Winter et al. als Marker für maligne Vorstufen verstanden (Winter et al. 2003a). Im Kolon, das stark EpCAM-positiv ist, konnte sogar auf Zellen von Polypen eine Überexpression beobachtet werden (Salem et al. 1993). Hepatozyten wiederum exprimieren EpCAM nur während der embryonalen Entwicklung, sowie bei regenerativen Prozessen nicht aber in hepatozellulären Karzinomen. Somit können mittels EpCAM hepatozelluläre Metastasen (welche EpCAM-negativ sind) von EpCAM-positiven Metastasen eines Cholangiokarzinomes differenziert werden (Proca et al. 2000). Maligne Veränderungen der Nieren und des Urothels rufen eine heterogene EpCAM-Überexpression hervor (Winter et al. 2003a). Im Gegensatz zur benignen Prostatahyperplasie sind bereits intraepitheliale Neoplasien der Prostata stark EpCAM-positiv (Poczatek et al. 1999, Winter et al. 2003a). In Mammakarzinomen korreliert die EpCAM-Überexpression zudem mit der Tumormasse, dem Lymphknotenstatus und dem Vorhandensein von Östrogenrezeptoren (Tandon et al. 1990). Auch das Plattenepithelkarzinom sowie Dys- und Hyperplasien der Lunge zeigen eine gesteigerte EpCAM-Expression. Das Lungenkarzinom weist ähnliche Abhängigkeiten der EpCAM-Expression von Tumorgroße, Differenzierungsgrad und Lymphknotenbefall wie das Mammakarzinom auf (Piyathilake et al. 2000). Zudem wurde über die *de novo*- EpCAM-Expression beim Zervixepithel berichtet. Diese korreliert mit dem Dysplasiegrad des Zervixepithels, während Differenzierungsmarker wie CK13 und Involucrin mit steigender EpCAM-Expression abnehmen (Litvinov et al. 1996). Bei malignen Veränderungen der Haut ist nur auf Basalzellkarzinomen EpCAM *de novo* nachweisbar (Tsubura et al. 1992).

Winter et al. kommen zu dem Schluss, dass eine *de novo*- EpCAM-Expression, wie im Plattenepithel der Prostata, der Haut oder der Cervix auf eine Dysplasie hinweisen. Da EpCAM bei Plattenepithelien nicht auf benigne Proliferation reagiert, kann es somit als Marker für prä maligne Veränderungen verstanden werden. Eine *Über*expression von EpCAM kann in den Geweben beobachtet werden, die schon im Gesunden positiv sind, und weist daher auf deren Proliferation und Dedifferenzierung hin (Winter et al. 2003a).

Vergleicht man den Verlauf der malignen Erkrankung mit der EpCAM-Expression, so korreliert meist eine starke Expression mit eher schlechter Prognose (Spizzo et al. 2004, Varga et al. 2004, Storcklein et al. 2004, Went et al. 2004, Fong et al. 2008).

Wenn man zirkulierende EpCAM-positive Zellen zirkulierenden Tumorzellen gleichsetzt, wird während der Dissemination von einer Downregulation ausgegangen. EpCAM war auf Zellen des Primärtumors und auf Zellen der Metastasen 10mal höher als auf disseminierten Tumorzellen nachweisbar. Die EpCAM-Expression scheint also abhängig von der lokalen Mikroumgebung zu sein (Chaubal et al. 1999, Rao et al. 2005).

EpCAM wird derzeit zur Diagnostik, als Angriffsmolekül gegen Karzinomzellen sowie bei der Therapieüberwachung genutzt und erforscht.

Studien über zirkulierende EpCAM-Zellen bei Nicht-Karzinompatienten für eine kritische Auseinandersetzung fehlen derzeit noch.

2.2.2.3 EpCAM bei Entzündung

Für Entzündungsreaktionen sind Adhäsionsmoleküle von zentraler Bedeutung, z.B. damit entzündliches Gewebe durch Immunzellen infiltriert werden kann, oder um die anschließende Regeneration mit Zellproliferation und -differenzierung zu ermöglichen. Es hat sich gezeigt, dass EpCAM während entzündlicher Prozesse hochreguliert wird. Nachgewiesen wurde dies bisher in der Leber und der Niere (Trzpis et al. 2007). Bei chronischen Leberentzündungen wird EpCAM *de novo* in den Hepatozyten exprimiert und korreliert bei Hepatitis B- und -C-Infektionen mit der Entzündungsintensität. Im Gegensatz dazu wird bei primär sklerosierenden Prozessen die EpCAM-Expression herunterreguliert (Breuhahn et al. 2006). Somit kann man sagen, dass EpCAM mit Zellregeneration und -differenzierung assoziiert ist bzw. eine Voraussetzung für diese sein kann (Breuhahn et al. 2006, de Boer et al. 1999). In der Niere berichten Trzpis et al. von einer Hochregulierung in den Zellen der Rinde nach Ischämie (Trzpis et al. 2007).

Auch im Intestinaltrakt sind Adhäsionsmoleküle für die Immunabwehr von entscheidender Bedeutung. Man hat EpCAM als homophiles Adhäsionsmolekül auf intraepithelialen Lymphozyten und intestinalem Epithel nachgewiesen. EpCAM wird somit als ein Molekül gedeutet, welches wichtig für die Abwehr von Mukosainfektionen ist (Nochi et al. 2004).

Über NF- κ -B kann TNF- α negativ die EpCAM-Expression regulieren (Gires et al. 2001). TNF- α ist ein wichtiger Mediator bei Entzündungen. NF- κ -B führt unter anderem zu Zellaktivierung, Zelldifferenzierung, Zytokinproduktion und Hemmung des programmierten Zelltodes (Apoptose). Im Gegensatz dazu berichten Flieger et al. von einem modulierenden Effekt von TNF- α , wobei TNF- α als Bindeglied zwischen der *de novo* EpCAM-Expression oder EpCAM-Überexpression in entzündlichen Geweben fungieren kann (Flieger et al. 2001, Trzpis et al. 2007).

3 ZIEL DIESER ARBEIT

In dieser Arbeit sollte erstmals die Frage beantwortet werden, ob sich EpCAM-positive Zellen in der Blutzirkulation allogenen stammzelltransplantierter Patienten nachweisen lassen. Bisher wurden zirkulierende EpCAM-positive Zellen noch nie unter diesem Gesichtspunkt untersucht. Es standen folgende Hypothesen im Mittelpunkt:

- Wenn zirkulierende EpCAM-positive Zellen regelmäßig im Blut allogenen stammzelltransplantierter Patienten auftreten, wann treten diese auf und welche Kinetik haben sie.
- In diesem Zusammenhang sollte der Einfluss der GvHD-Prophylaxe bzw.-Therapie auf die EpCAM-positiven Zellen in Korrelation mit einer akuten bzw. chronischen GvHD evaluiert werden.
- Welche Unterschiede bestehen bei den unterschiedlichen Erkrankungen, die ursächlich für die allogene HSCT waren (ALL, AML, CML und Myelom), im Verlauf der zirkulierenden EpCAM-positiven Zellen.

Besonderes Augenmerk lag dabei auf der Suche nach Hinweisen, ob diese Zellen epithelialen Ursprungs und damit Ausdruck einer Epithelschädigung bzw. Geweberegeneration sind, oder ob sie der Lymphohämatopoese entstammen könnten. Das Ausmaß des Auftretens EpCAM-positiver Zellen in der Blutzirkulation wurde mit dem klinischen Verlauf nach allogener HSCT verglichen, um Hinweise zu erhalten, welche Einflussgrößen (z.B. Aktivität der GvHD, Therapie, andere entzündliche Prozesse, operative Eingriffe) das Vorkommen von zirkulierenden EpCAM-positiven Zellen beeinflussen.

4 MATERIAL UND METHODIK

4.1 Patientenauswahl

Aus der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin II, Abteilung für Onkologie/Hämatologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena wurden von 2003 bis 2007 35 Patienten, welche sich aufgrund einer malignen hämatologischen Systemerkrankung, einer allogenen HSCT unterzogen, untersucht. Aus Blutproben dieser Patienten wurden zirkulierende EpCAM-positive Zellen während des stationären Aufenthaltes in Abständen von etwa einer Woche und in der nachstationären Phase entsprechend der klinischen Erfordernisse in der Poliklinik etwa alle acht Wochen bestimmt.

4.2 Materialien

4.2.1 Geräte

- | | |
|---------------------------------|-----------------------|
| ▪ Laser Scanning Cytometer, LSC | CompuCyte Corporation |
| ▪ Zentrifuge Megafuge 2.0R | Heraeus Instrumente |

4.2.2 Verbrauchsmaterialien

- | | |
|--|--------------------------|
| ▪ Pipetten, 1000, 200, 10 | Eppendorf |
| ▪ Microtubes, 2ml | Sarstedt |
| ▪ Tubes, 10ml | grainer bio-one Cellstar |
| ▪ Pasteurpipetten | Copan |
| ▪ Menzel-Gläser® Polysine™ Objektträger | Menzel GmbH & Co KG |
| Fettstift: Liquid Blocker Super Pap-Pen-Mini | SCI Science Services |

4.2.3 Antikörper und Chemikalien

- | | |
|---|--------------------------|
| ▪ Buffer EL Erythrozyten-Lysepuffer | Qiagen |
| ▪ PBS-EDTA-Puffer (PE-Puffer) 2 mM EDTA | Sigma-Aldrich |
| ▪ FcR-Blockierungsreagens | Miltenyi Biotec, Germany |
| ▪ HEA-FITC | Miltenyi Biotec, Germany |
| ▪ CD 45-PE | Miltenyi Biotec, Germany |
| ▪ EDTA-Blut | |

4.2.4 Patientenproben

Den 35 Patienten wurde eine Monovette EDTA-Blut mittels peripher venöser Punktion entnommen. Dies erfolgte mit deren Einverständnis im Rahmen der konventionellen Blutbildkontrolle zur Überprüfung des Krankheitsverlaufes.

4.3 Methoden

4.3.1 Nachweis der EpCAM-positiven Zellen

Der erste Schritt der Aufbereitung war die Erythrozytenlyse. Dafür wurde 1 ml Blut auf 9 ml Erythrozytenlysepuffer gegeben und 10 min bei Raumtemperatur lysiert. Anschließend wurden die Proben für 10 min mit 1200 U/min bei 14°C zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen, damit nur das Zellpellet das zirkulierende EpCAM-positive Zellen und Leukozyten umfasste, zurück blieb.

Der zweite Schritt bestand in der Antikörperzugabe. Das Pellet wurde dazu in 500 µl PE-Puffer resuspendiert. Der Suspension wurde anschließend zur Inkubation 30,0 µl FcR-Blockingreagenz, 12,5 µl HEA-FITC und 2,5 µl CD 45-PE hinzugefügt.

FcR-Blockierungsreagens blockiert Fc-Rezeptor-exprimierende Zellen z.B. B-Lymphozyten, Makrophagen und Monozyten (Miltenyi Biotec).

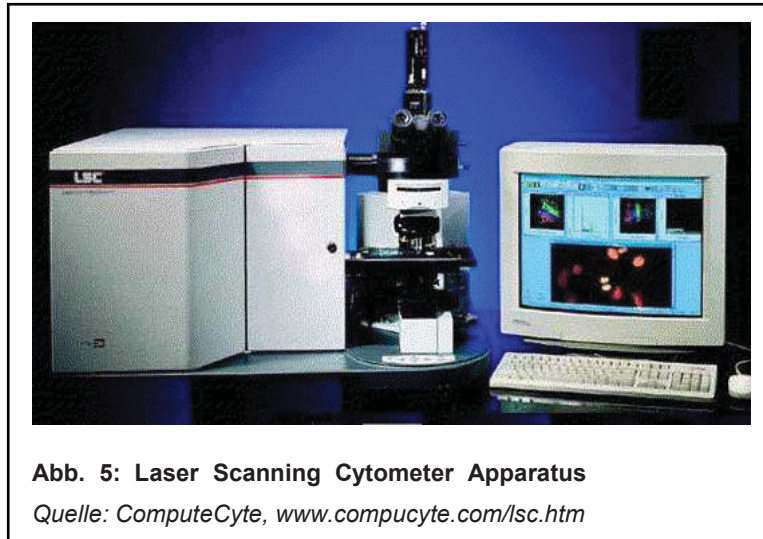
HEA-FITC ist ein aus Mäusen gewonnener und mit Fluorochrom gekoppelter Antikörper gegen das Humane Epitheliale Antigen (HEA, CD326, EpCAM). Dies führt zu einer grünen Fluoreszenzmarkierung von EpCAM-positiven Zellen (Miltenyi Biotec).

CD45-PE bindet CD45, einen Rezeptor, der auf nahezu allen Zellen hämatopoetischen Ursprungs, ausgenommen Erythrozyten, exprimiert wird. Somit können Leukozyten von nicht-hämatopoetischen Zellen durch die Kopplung des Antikörpers mit einem roten fluoreszierenden Farbstoff unterschieden werden (Miltenyi Biotec).

Nach kurzem Schwenken und einer Inkubationszeit von 15 min im Kühlschrank wurden die Proben mit 455 µl PE-Puffer aufgefüllt und standen zur Messung mit dem LSC bereit.

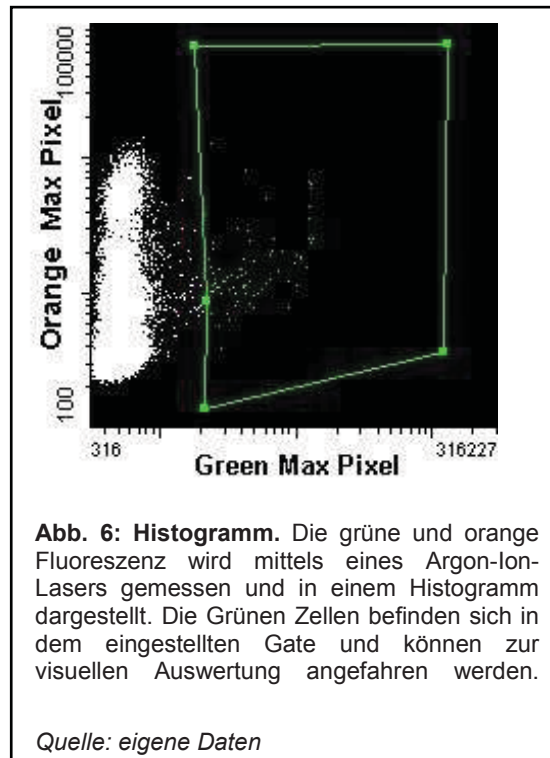
4.3.2 Nachweis der EpCAM-positiven Zellen

Im Anschluss an die Blutaufbereitung erfolgte die Messung und Auswertung der Proben. Zurzeit stand dem onkologischen Labor ein LSC zur Verfügung (Abb. 5).



Dazu wurden 20 µl der Probe in ein mit Fettstift abgegrenztes Feld auf einen Objektträger aufgetragen. Dieser wurde dann auf dem motorgetriebenen Scanning-Mikroskoptisch platziert. Das Objektiv mit 20-facher Vergrößerung konnte manuell auf eine scharfe Abbildung eingestellt werden. Ein Laserstrahl des LSC tastete eine definierte Feldgröße ab, in der eine definierte Zellzahl ausgewertet werden konnte. Über Vorwärtstreulicht konnten die Zellen erkannt werden. Dabei wurden die x-y-Koordinaten jeder einzelnen Zelle gespeichert. Dies ermöglichte das spätere Wiederauffinden und damit die visuelle Kontrolle jeder einzelnen, registrierten Zelle.

Gleichzeitig wurde mit Hilfe des Argon-Ionen-Lasers (Wellenlänge 488 nm) die Fluoreszenz gemessen. Die Wellenlängen für die Detektion des emittierten Fluoreszenzlichts betragen für die grüne Fluoreszenz 515-545 nm, für die orangefarbene 565-585 nm (Pachmann et al. 2001). Die Verteilung der Zellen bezüglich ihrer Fluoreszenz wurde in einem Histogramm dargestellt (Abb. 6). Jeder weiße Punkt repräsentierte eine Zelle. Im grün umrahmten Fenster (Gate) wurden die als grün, fluoreszierend erkannten, Zellen abgebildet und standen zur Auswertung zur Verfügung.



Die visuelle Kontrolle erfolgte mit 40-facher Vergrößerung. Der Scanning-Tisch fuhr nacheinander die einzelnen Ereignisse im gewählten Fenster an, sodass die Spezifität der Markierung und die Zellmorphologie beurteilt werden konnten. Für epitheliale Zellen ist eine kappenförmige grüne Fluoreszenzmarkierung typisch. Lebende Zellen zeigten die grüne Fluoreszenz ausschließlich auf ihrer Zelloberfläche, sodass sich tote Zellen, welche auch intrazelluläre grüne Markierungen aufweisen, von der Quantifizierung ausschließen ließen. Fluoreszierende Partikel, die von Makrophagen aufgenommen wurden oder unspezifische Fluoreszenz von eosinophilen Granula in Granulozyten, wurden ebenso ausgeschossen (Pachmann et al. 2001, Pachmann et al. 2005).

Durch die visuelle Kontrolle wurde gewährleistet, dass bei der anschließenden Berechnung die mögliche Verfälschung der Werte durch Artefakte und EpCAM-negative Zellen gering gehalten wurde. Anhand der ausgezählten, wirklichen EpCAM-positiven Zellen errechnete man dann die Zellzahl auf 1 ml EDTA-Blut. Die untere Nachweisgrenze liegt bei 10 Zellen pro ml Blut.

Abb. 7 zeigt einen Ausschnitt der Probe auf dem Objektträger. Die orange fluoreszierenden Zellen mit CD45 sind gut von den grün fluoreszierenden, epithelialen Zellen abzugrenzen.

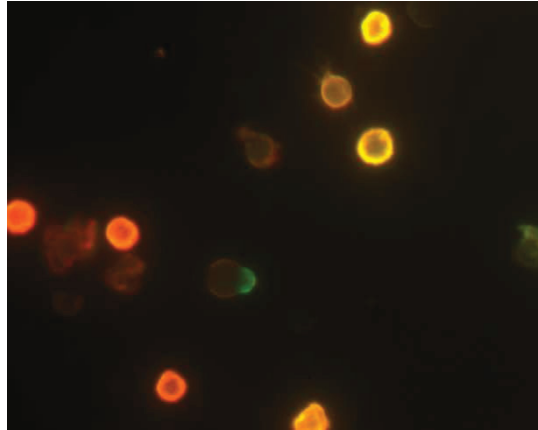


Abb. 7: Mikroskopauszug der fluoreszierenden Zellen mit 20facher Vergrößerung. Die orange fluoreszierenden CD45-positive Zellen sind gut von der grün fluoreszierenden EpCAM-positiven Zelle zu unterscheiden.

Quelle: eigene Daten

In Abb. 8 ist eine Epithelzelle noch einmal in stärkerer Vergrößerung (40fach) dargestellt. Auf diese Weise wurden die Zellen gesichtet und entschieden, ob es sich um EpCAM-positive Zellen oder Artefakte handelte. EpCAM-positive Zellen sind an der grün fluoreszierenden, kappenförmigen Oberflächenmarkierung (Cap) erkennbar.

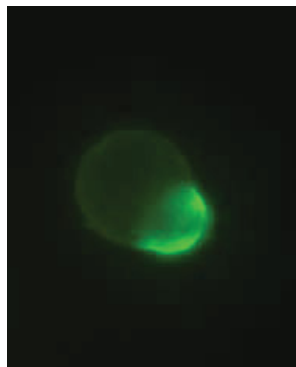


Abb. 8: EpCAM-positive Zellen unter dem Mikroskop mit 40facher Vergrößerung. Die EpCAM-positive Zelle ist an dem grün fluoreszierenden Cap erkennbar.

Quelle: eigene Daten

5 ERGEBNISSE

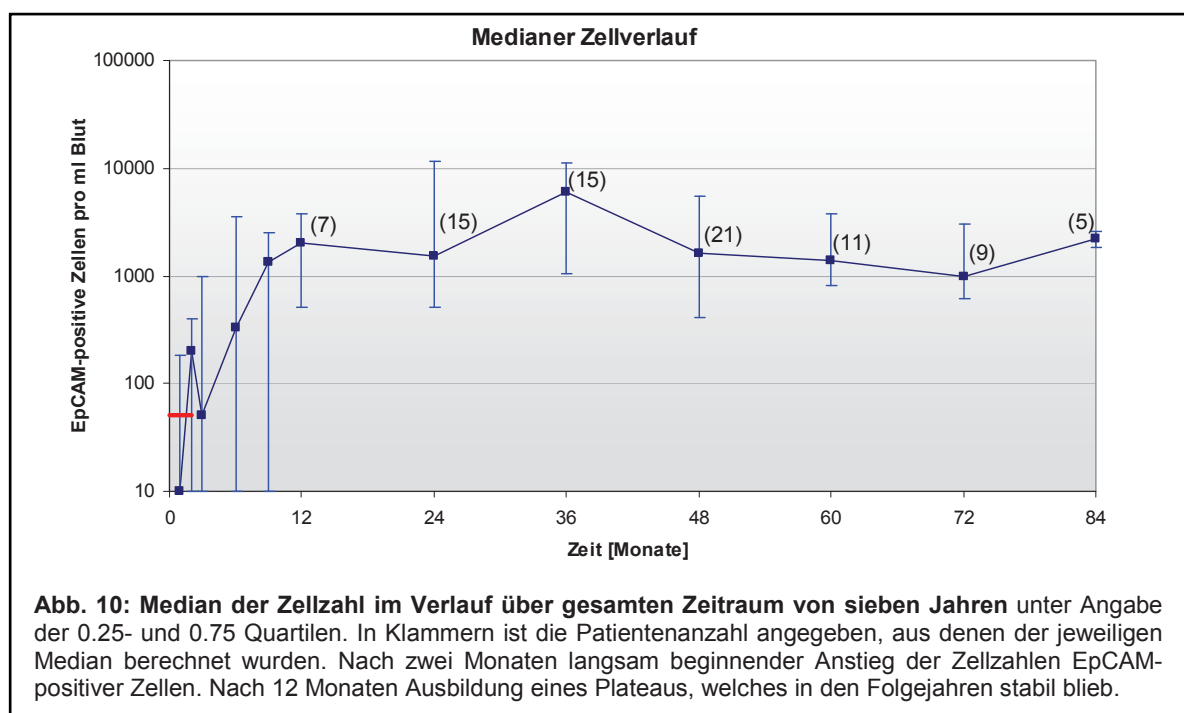
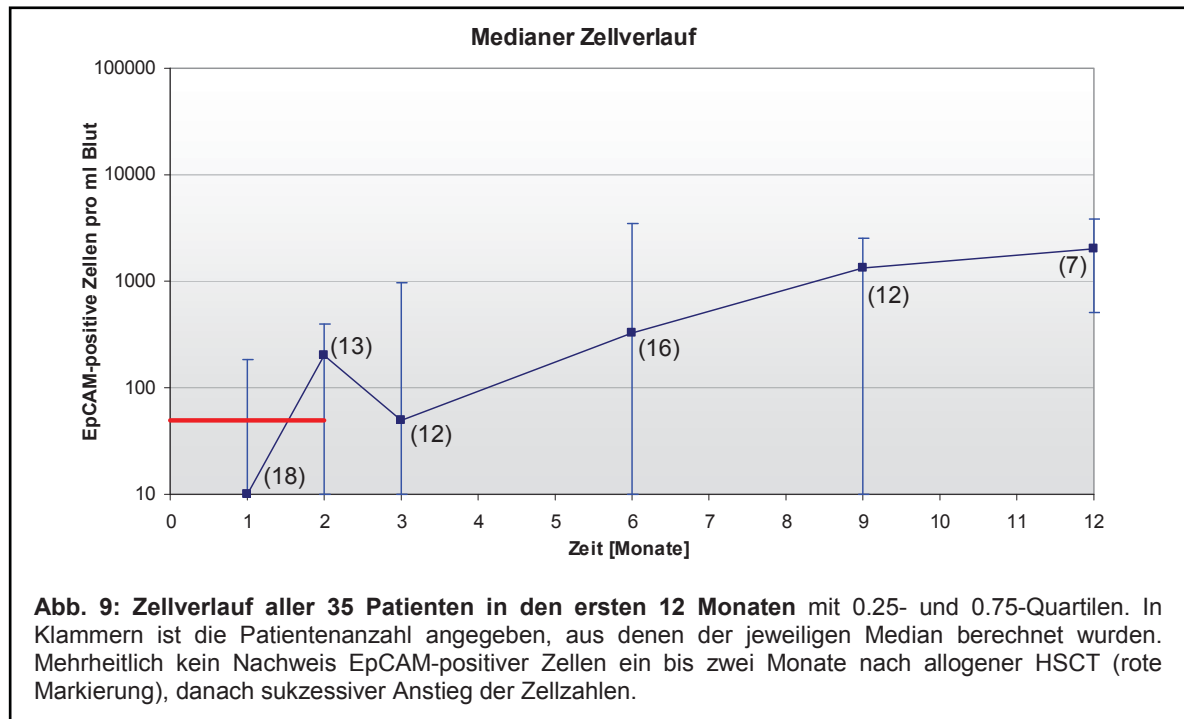
5.1 Nachweis EpCAM-positiver Zellen im zirkulierenden Blut

Es wurden Proben aus peripherem Blut von 35 Patienten (davon 19 Patienten mit CML, vier Patienten mit Myelom, vier Patienten mit ALL und acht Patienten mit AML), nach allogener HSCT analysiert. 92,6% (25/27 Patienten) wiesen zu irgendeinem Zeitpunkt zirkulierende EpCAM-positive Zellen auf. Da im Verlauf der Analysen festgestellt wurde, dass erst ab dem zweiten bis neunten Monat nach allogener HSCT EpCAM-positive Zellen nachweisbar waren, gingen acht Patienten, deren Beobachtungszeitraum kürzer als ein Jahr war, nicht in diese Langzeitbetrachtung ein. Im Betrachtungszeitraum, der größer als einem Jahr war, wiesen zwei der 27 Patienten keine EpCAM-positiven Zellen auf. Dies entspricht einem prozentualen Anteil von 7,4%.

5.2 Medianer Zellverlauf

Abb. 9 und Abb. 10 zeigen den Verlauf der zirkulierenden EpCAM-positiven Zellen aller 35 Patienten im Median unter Einbezug der 0.25- und 0.75-Quartile. Der Tag der allogenen HSCT wurde als Tag 0 gesetzt. Es flossen keine Werte ein, die zu früheren Zeitpunkten gemessen wurden. Im ersten Jahr nach allogener HSCT wurden in kurzen Abständen Messungen erhoben und deshalb in engeren Zeitspannen folgende Mediane gebildet: in den ersten drei Monaten monatlich, bis zum Ablauf des ersten Jahres alle drei Monate und folgend bis zum siebten Jahr jährlich. Die Anzahl der Patienten, die zu der jeweiligen Medianberechnung herangezogen wurden, sind in Klammern angegeben.

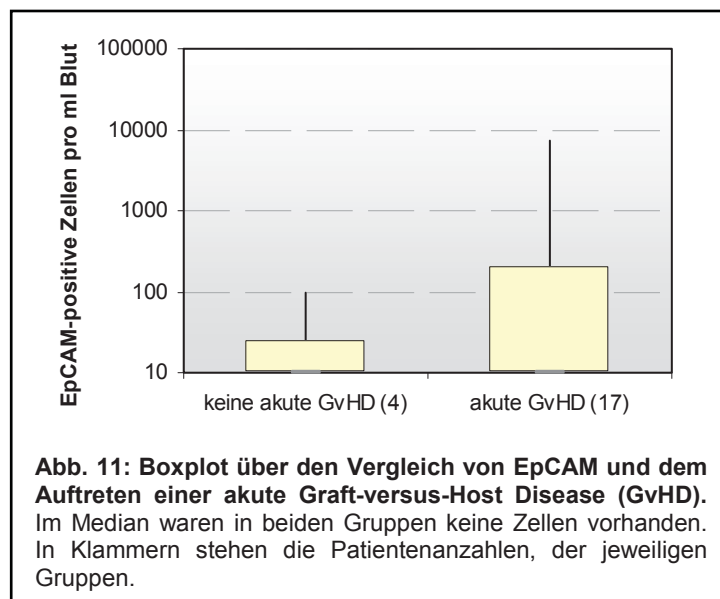
Um den Zellanstieg besser zu verdeutlichen, wurde in Abb. 9 nur der mediane Verlauf der ersten 12 Monate dargestellt. In den ersten sechs bis acht Wochen waren im Blut der Patienten mehrheitlich keine EpCAM-positiven Zellen nachweisbar (rote Markierung). Im Zeitraum vom dritten bis 12. Monat nach allogener HSCT kam es dann zu einem sukzessiven Anstieg der EpCAM-positiven Zellen auf im Median über 1.000/ml Blut. Danach hielt sich ein relativ gleich bleibendes Zellzahlniveau. In Einzelfällen konnten nach dem zweiten Monat auch Zellzahlen im Bereich von 10.000-100.000 EpCAM-positive Zellen/ml Blut nachgewiesen werden.



5.3 Korrelation von EpCAM-positiven Zellen und GvHD

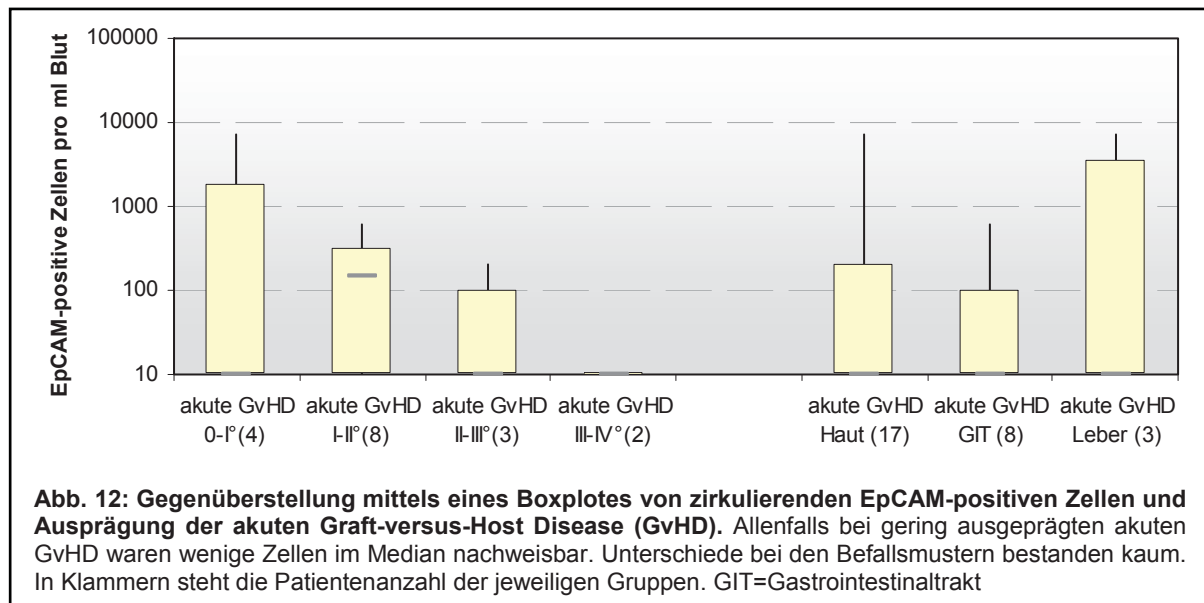
5.3.1 Akute GvHD

Um eine mögliche Korrelation EpCAM-positiver Zellen und akuter GvHD zu untersuchen, wurden 21 Patienten, bei denen der Zellverlauf bis zum 100. Tag dokumentiert wurde, analysiert. Diese Zeitspanne wurde gewählt, da die GvHD als akut definiert wird, wenn diese bis zum 100. Tag nach allogener HSCT auftritt. Vier dieser 21 Patienten erkrankten nicht an einer akuten GvHD. Somit konnte aus 17 Medianen von den Patienten mit akuter GvHD bzw. von den vier ohne akute GvHD zwei übergreifende Gesamtmediane berechnet werden. Der Vergleich dieser Gesamtmedianwerte sowie der Maximalwerte, der Minimalwerte, der 0.75- und der 0.25- Quartile wurde mittels eines Boxplots grafisch dargestellt (Abb. 11). Unabhängig davon, ob eine akute GvHD auftrat oder nicht, ließen sich - abgesehen von Einzelfällen - bis zum 100. Tag im Median keine EpCAM-positive Zellen/ml Blut nachweisen. Jedoch sind die Spannweiten und die Quartilabstände in der Gruppe mit akuter GvHD deutlich größer, d.h. es wurden häufiger auch hohe EpCAM-positive Zellzahlen gemessen. Für einen Vergleich über die Verläufe der beiden Gruppen lagen zu wenige Messwerte vor.



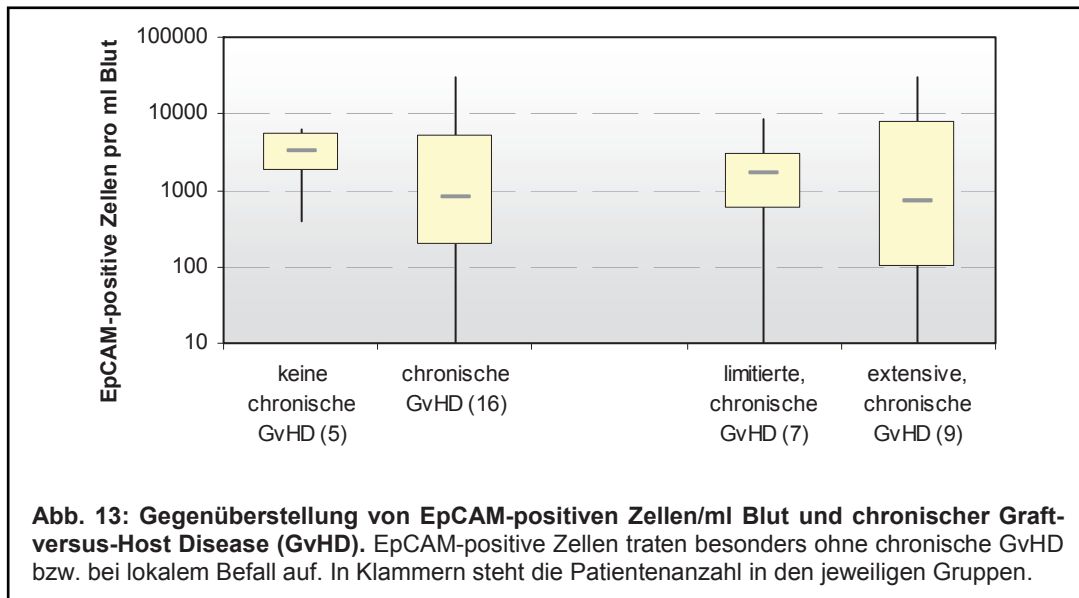
Die folgende Abb. 12 veranschaulicht den Vergleich der medianen EpCAM-positiven Zellzahlen/ml Blut in Abhängigkeit der vier Schweregrade der GvHD nach Glucksberg und der drei hauptsächlich befallenen Organe bei akuter GvHD: Haut, Gastrointestinaltrakt (GIT) und Leber (Glucksberg et al. 1974). Bei allen unseren Patienten mit akuter GvHD trat ein Haut- bzw. Schleimhautbefall auf. Zusätzlich kam es bei einigen Patienten zu einer Manifestation der akuten GvHD an GIT oder Leber.

Im Allgemeinen waren keine oder nur wenige EpCAM-positive Zellen/ml Blut bei akuter GvHD nachweisbar. Allenfalls bei gering ausgeprägter akuten GvHD konnten wenige EpCAM-positive Zellen im Median nachgewiesen werden. Unterschiede der Medianwerte bei den drei verschiedenen Befallsmustern bestanden kaum. In Einzelfällen zeigten sich Spitzenwerte von bis zu 7.000 EpCAM-positiven Zellen/ml Blut.



5.3.2 Chronische GvHD

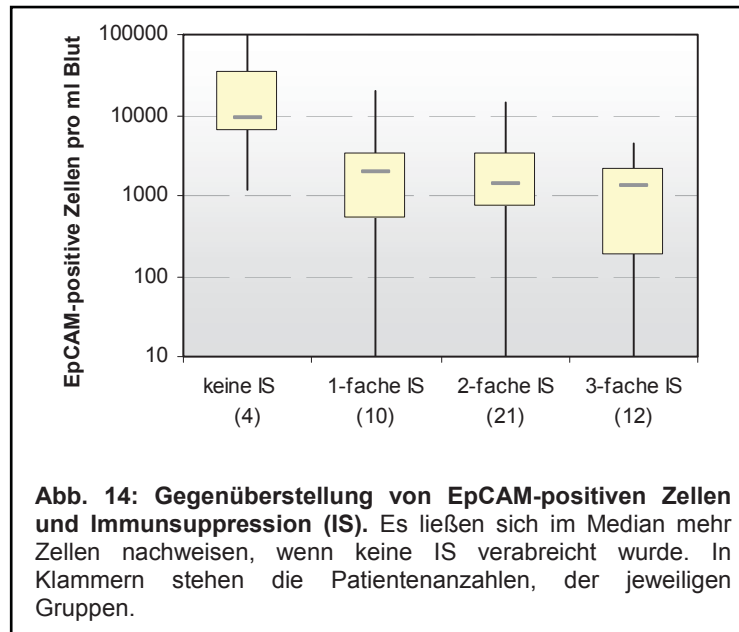
Zur Betrachtung von möglichen Zusammenhängen der chronischen GvHD und EpCAM-positiven Zellen wurden nach derselben Vorgehensweise wie bei der akuten GvHD Gesamtmediane, 0.25-, 0.75-Quartile sowie Minimal- und Maximalwerte bestimmt, um diese mittels eines Boxplots zu vergleichen. Die Messwerte des vierten Jahres stellten die Basis dar. Dieses Jahr wurde gewählt, um möglichst viele Patienten heranziehen zu können. Für 21 Patienten lagen Messwerte vor, fünf davon erkrankten nicht an einer chronischen GvHD. Des Weiteren wurde nach der Seattle Klassifikation die limitierte chronische GvHD der extensiven chronischen Verlaufsform gegenüber gestellt (Shulman et al. 1980, Abb. 13). Bei Patienten ohne chronische GvHD oder limitiertem Verlauf ließen sich im Median mehr EpCAM-positive Zellen nachweisen als bei Patienten mit extensiver GvHD.



5.4 Korrelation EpCAM-positiver Zellen und medikamentöse Immunsuppression der chronischen GvHD

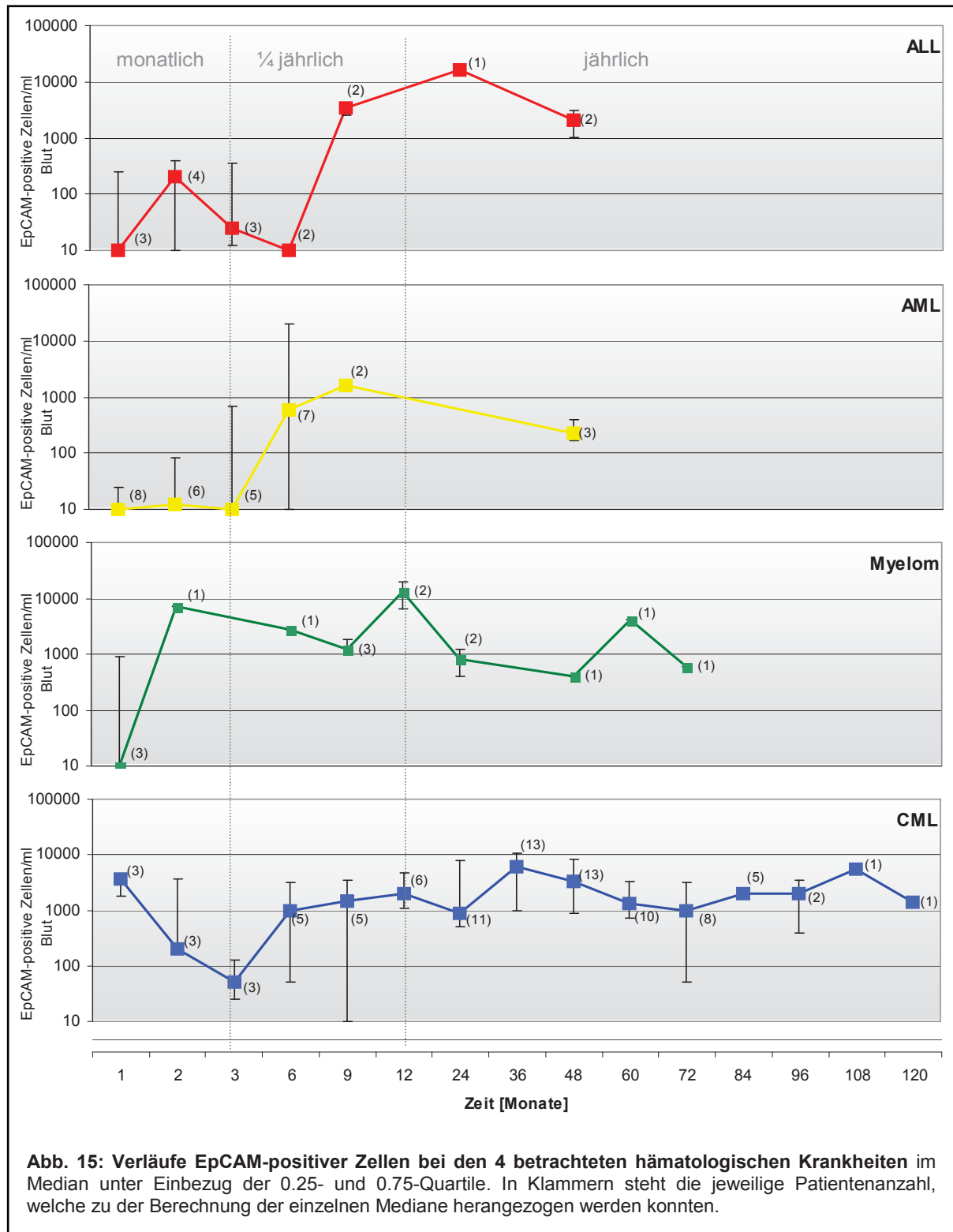
Der GvHD-Verlauf wird wesentlich durch dessen Therapie beeinflusst. Somit ist es wichtig auch diese zu betrachten, wenn man EpCAM-positive Zellen in Zusammenhang zur GvHD untersuchen möchte. Da EpCAM-positive Zellen während der akuten GvHD nur in Ausnahmefällen auftraten, beziehen sich die folgenden Betrachtungen nur auf die Therapie der chronischen GvHD.

Je nach Schweregrad der chronischen GvHD erfolgte die medikamentöse Immunsuppression 1-fach, oder in 2-, bzw. 3-facher-Kombination. Abb. 14 zeigt das Auftreten EpCAM-positiver Zellen im Blut in Abhängigkeit von der Intensität der Immunsuppression (keine, 1-, 2- und 3-fach). Dabei wurde aus den Einzelwerten der EpCAM-positiven Zellzahlen der Patienten, die ohne Immunsuppressiva oder der Patienten während der Einnahme der 1-, 2- und 3-fachen Immunsuppression erhoben wurden, ein Median berechnet. Zum Schluss wurde von den Einzelmedienen der jeweiligen Gruppen die Gesamtmediane, die 0.25-, 0.75-Quartile sowie Minimal- und Maximalwerte ermittelt und graphisch zusammengefasst. Ohne Immunsuppressiva waren bedeutend mehr EpCAM-positive Zellen/ml Blut im Median nachweisbar. Beim Vergleich der verschiedenen Kombinationen an Immunsuppressiva fielen die Zellzahlunterschiede zwischen den Gruppen hingegen deutlich geringer aus.



5.5 Korrelationen von Krankheitsentität und Zellzahlverlauf der EpCAM-positiven Zellen

Ein weiterer interessanter Aspekt war, ob Unterschiede im Verlaufsbild der EpCAM-positiven Zellen bei den vier Krankheitsentitäten (ALL, AML, Myelom und CML) zu beobachten waren. Nach demselben Vorgehen wie schon bei dem medianen Zellzahlverlauf aller 35 Patienten wurden die EpCAM-positiven Zellzahlverläufe für jede Krankheitsentität berechnet und graphisch dargestellt (Abb. 15). Die Anzahl der Patienten, die zu den jeweiligen Medianberechnungen herangezogen werden konnten, wurden in Klammern in den Diagrammen dargestellt. Die akuten Leukämien konnten maximal über 48 Monate untersucht werden. Der Anstieg EpCAM-positiver Zellen war vergleichsweise spät nach sechs Monaten bei den AML-Patienten und nach neun Monaten bei den ALL-Patienten erfolgt. Im Median ließen sich im Folgenden bei den AML-Patienten am wenigsten EpCAM-positive Zellen nachweisen. Im Gegensatz dazu konnten EpCAM-positive Zellen bei den Myelom- und CML-Patienten schon vor dem zweiten Monat nach HSCT nachgewiesen werden. Deren Zellzahl-niveaus bewegten sich zwischen 1.000-10.000 EpCAM-positiven Zellen/ml Blut. Im Allgemeinen wichen die vier Zellzahlverläufe nicht wesentlich voneinander ab. Spätestens nach zwei bis drei Monaten stiegen die EpCAM-positiven Zellen regelhaft an. Danach blieben sie auf einem gleich bleibenden Niveau.

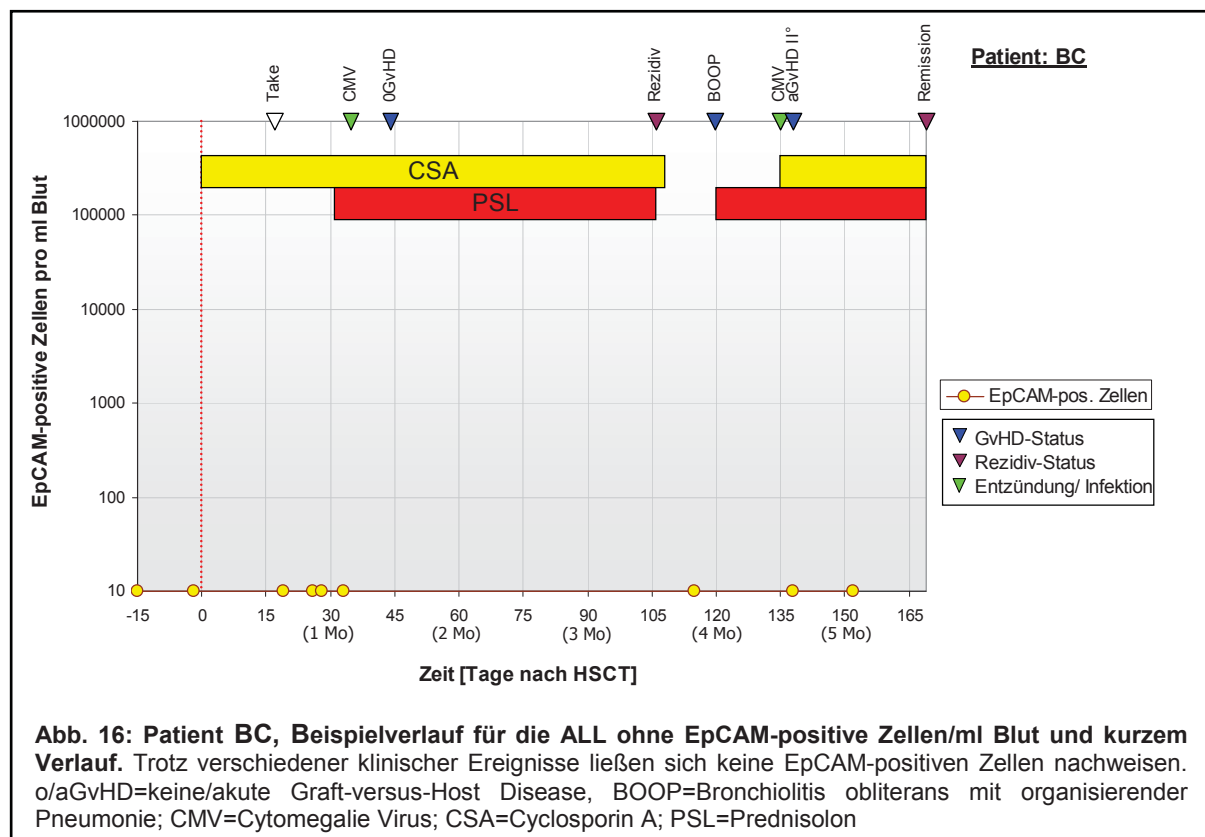


Im Folgenden wird auf die vier Krankheitsentitäten und deren Verläufe EpCAM-positiver Zellzahlen genauer eingegangen.

5.5.1 Verläufe bei der ALL

Bei vier Patienten war eine ALL der Anlass für eine allogene HSCT.

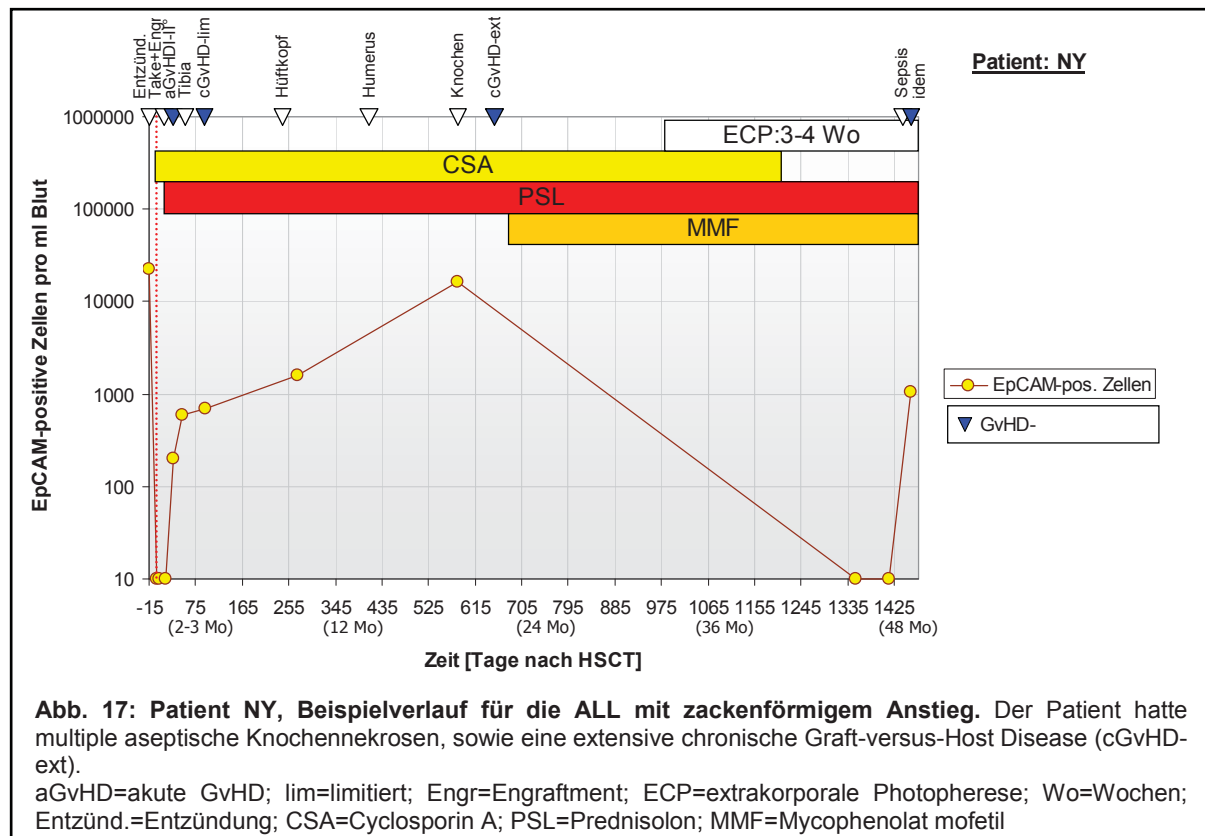
Zwei Patienten wurden kürzer als sechs Monate gemessen und zeigten während dieser akut toxischen Phase trotz verschiedener Ereignisse konstant 0 EpCAM-positive Zellen/ml Blut. Als Beispiel wird Patient BC (Abb. 16) gezeigt. Im Verlauf trat ein Rezidiv, eine BOOP, eine akute GvHD II° und eine CMV-Reaktivierung auf. Beide Patienten erhielten eine 2-fache Immunsuppression mit Unterbrechung bei Patient BC. Beide erkrankten nicht an einer chronischen GvHD und sind an Komplikationen der akuten GvHD verstorben.



Die anderen beiden Patienten konnten über einen Zeitraum von vier Jahren beobachtet werden. Über den Gesamtzeitraum betrachtet, wiesen sie ein relativ niedriges Zellzahlniveau auf. Vorübergehend konnte man jedoch steile Anstiege beobachten.

Beispielhaft wird Patient NY (Abb. 17) dargestellt. Als Besonderheit wies dieser Patient während einer rezidierten Nagelbettentzündung (Entzünd.) EpCAM-positive Zellen schon vor HSCT auf. Im Verlauf nach HSCT zeigte er einen einmaligen steilen Anstieg auf 16.263 EpCAM-positive Zellen/ml Blut (10-facher Anstieg gegenüber dem Vorwert). Klinisch entwickelte sich aus einer akuten GvHD I-II° erst eine limitierte und später eine extensive chronische GvHD. Diese wurde mit ECP und 3-facher Immunsuppression behandelt. Des Weiteren wurden aseptische Knochennekrosen (Tibia, Hüftkopf, Humerus, Knochen) mit

Osteosyntheseoperationen versorgt. Zusätzlich verursachte ein unbekannter Infektionsherd ein septisches Bild, kompliziert durch eine allergische Antibiotikareaktion wie beim Lyell-Syndrom. Während des Auftretens der Knochennekrosen und deren Versorgung stiegen die Zellen kontinuierlich an. Unmittelbar danach existierten keine Messwerte, sodass über den folgenden Verlauf keine Aussagen gemacht werden konnten. Auch nach der Sepsis ließen sich vermehrt EpCAM-positive Zellen im Blut nachweisen.



Der zweite Patient hatte ebenfalls zweimalig kurze Peaks der Zellzahlen von 0 auf über 5.000 EpCAM-positive Zellen/ml. Nach einer akuten GvHD I-II° blieb die chronische GvHD limitiert. Über den gesamten Zeitraum erfolgte eine 2-fache Immunsuppression.

5.5.2 Zellverläufe bei der AML

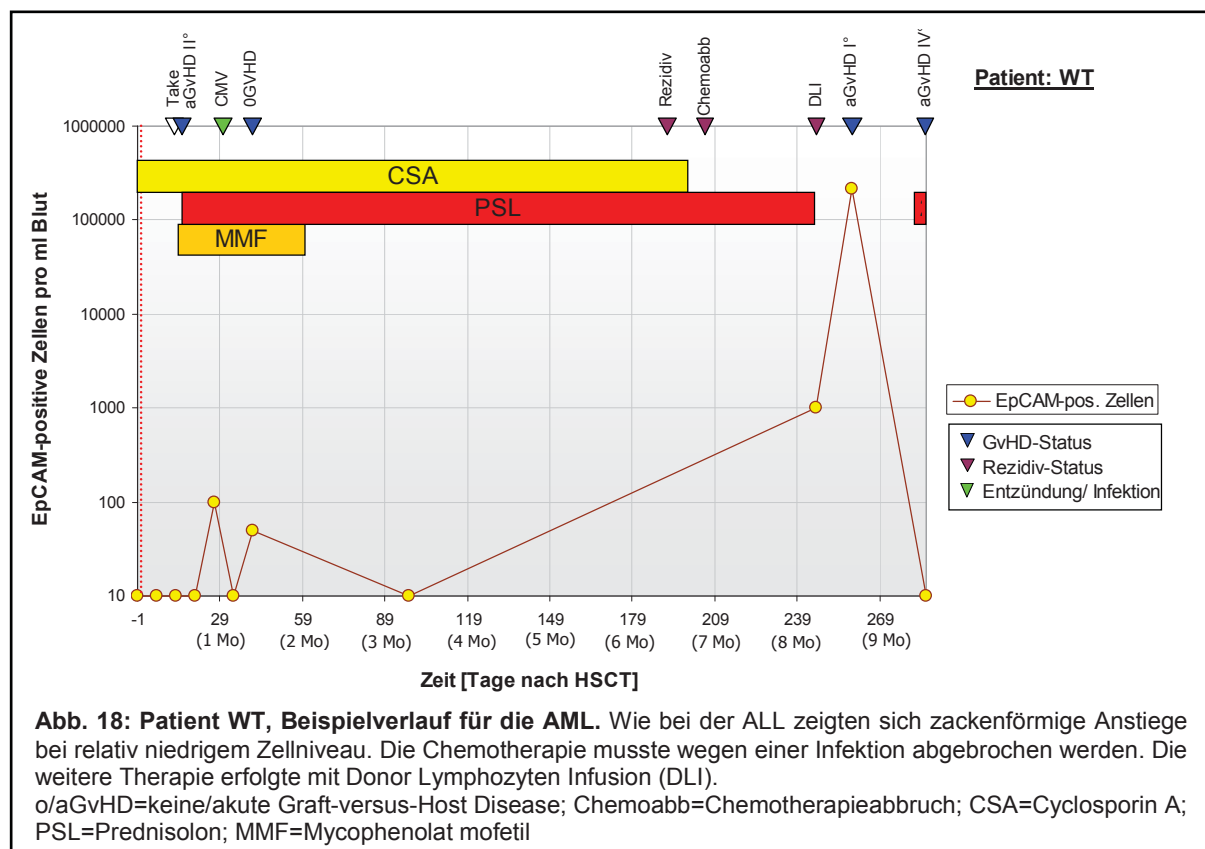
Unter den Patienten befanden sich acht Patienten mit einer AML.

Im Allgemeinen ließen sich für sie dieselben Aussagen wie bei der ALL treffen, nämlich dass bei niedrigerem Niveau EpCAM-positiver Zellen vorübergehend zackenförmig Spitzenwerte zu verzeichnen waren. Anzumerken ist, dass fünf Patienten kürzer als ein Jahr verfolgt wurden, drei länger als ein Jahr.

Alle acht Patienten entwickelten eine akute GvHD. Sofern diese nur einen Grad 0-I° erreichte, erfolgte die Immunsuppression 1-fach. Bei höhergradiger Ausprägung, d.h. Grad II–IV, wurde auf 2- bzw. 3-fache Immunsuppression erweitert.

Die fünf Patienten, welche kürzer als ein Jahr beobachtet wurden, entwickelten keine eindeutige chronische GvHD. Vier dieser Patienten erlitten ein Rezidiv ihrer Grunderkrankung. Der fünfte Patient entwickelte eine CMV-Kolitis, an der er verstarb.

Beispielhaft wird der Patient WT dargestellt. Unmittelbar nach allogener HSCT waren keine bzw. nur wenige EpCAM-positive Zellen im Blut nachweisbar. Nach acht Monaten stiegen die EpCAM-positiven Zellen peakförmig (217.145 EpCAM-positive Zellen/ml Blut) an. Kurz vor dem Anstieg wurde ein Rezidiv diagnostiziert, welches mit intensiver Chemotherapie behandelt wurde. Wegen des Rezidivs wurde die Immunsuppression komplett ausgesetzt daraufhin entwickelte sich der steile Anstieg der EpCAM-positiven Zellen. Allerdings musste wegen einer Infektion die Chemotherapie abgebrochen werden. Später wurde die Therapie mit DLI ergänzt, woraufhin sich erneut eine akute GvHD IV° der Haut entwickelte (Abb. 18).



Ähnlich war der Verlauf bei Patient FS. Nach dem Rezidiv und wiederkehrender akuter GvHD in Folge der pausierten Immunsuppression folgte ein Peak der EpCAM-positiven Zellen (von 0 auf 59.304 EpCAM-positive Zellen/ml Blut) vier Monate nach allogener HSCT. Zwei Wochen vor allogener HSCT zeigte dieser Patient eine Wundheilungsstörung einer Thorakotomienarbe. Vier Tage nach der operativen Sanierung dieser Narbe stiegen die

EpCAM-positiven Zellen auf 2.600/ml Blut, um danach rasch wieder abzufallen. Zum Zeitpunkt der Rezidivdiagnosen von Patient KS und NR wurde die Immunsuppression ebenfalls abgesetzt. Zeitgleich kam es zu Zellzahlanstiegen (700 bzw. 2.400 EpCAM-positive Zellen/ml Blut). Bei Patient SB zeigte sich ebenfalls ein peakförmiger Anstieg (von 0 auf 19.092 EpCAM-positive Zellen/ml Blut, zwei Monate nach allogener SZT). Zeitgleich konnte eine Choledocholithiasis diagnostiziert werden, die mittels endoskopisch retrograder Cholangiopankreatikographie (ERCP) behandelt wurde. Nach dieser Prozedur fiel das Zellniveau. Eine stattgehabte CMV-Infektion war zu diesem Zeitpunkt klinisch bereits abgeklungen.

Die drei Patienten, welche länger als ein Jahr beobachtet werden konnten, hatten keine oder nur sehr wenige EpCAM-positive Zellen/ml Blut mit temporären Anstiegen (200 bis 38.500 Zellen/ml Blut). Alle drei entwickelten eine chronische GvHD. Dabei korrelierte die Peakhöhe nicht direkt mit dem klinischen Grad der chronischen GvHD. Der Patient mit dem sehr hohen Peak zeigt nur eine limitierte chronische GvHD, welche zum Zeitpunkt des Gipfels klinisch nur minimal auffällig war. Die anderen beiden hatten eine extensive chronische GvHD und wurden entsprechend intensiv immunsuppressiv behandelt.

5.5.3 Verläufe beim Multiplen Myelom (Myelom)

Bei vier Patienten wurde die allogene HSCT zur Therapie eines Myeloms eingesetzt.

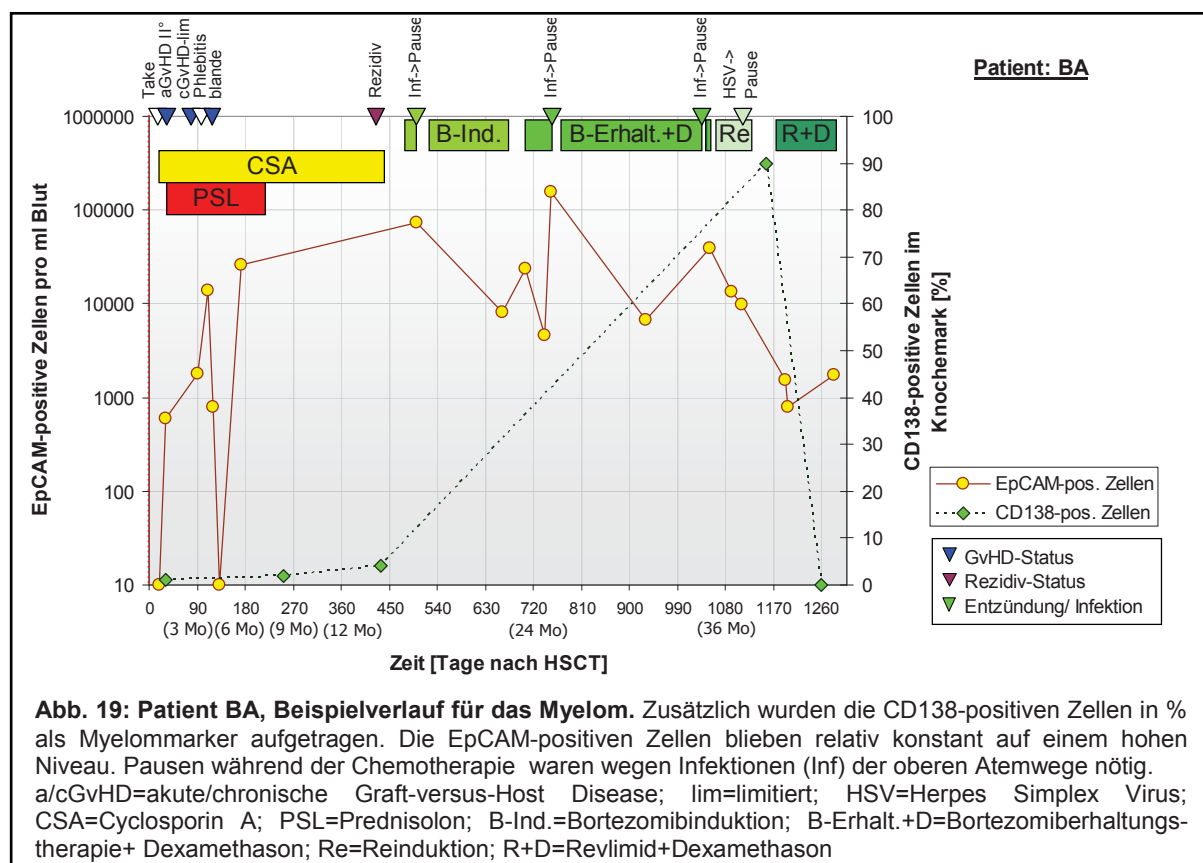
Bei den Zellverläufen der Myelom-Patienten konnte man beobachten, dass die EpCAM-positiven Zellen nach dem raschen Anstieg auf einem relativ gleichförmigen Niveau blieben, ohne ausgeprägte Spitzenwerte wie bei den akuten Leukämien aufzuweisen.

Alle vier Patienten erlitten ein Rezidiv ihrer Grunderkrankung. Die Anstiege der EpCAM-positiven Zellen waren zum Zeitpunkt der Rezidivdiagnose bereits erfolgt.

Bei einem Patienten ließen sich über den gesamten Zeitraum trotz entzündlicher Ereignisse und eines operativen Eingriffes sowie Chemotherapie keine EpCAM-positiven Zellen in der Blutzirkulation nachweisen. Dieser Patient entwickelte weder eine akute noch eine chronische GvHD. Sein Rezidiv wurde mit Thalidomid unter Dosisanpassung in Abhängigkeit vom Allgemeinzustand therapiert. Nach Entwicklung eines malignen Pleura- sowie Perikardergusses erfolgte die Therapie mit Anlage einer Pleuradrainage sowie medikamentös mit Idarubicin und Dexamethason.

Die drei Patienten mit Nachweis von zirkulierenden EpCAM-positiven Zellen entwickelten eine akute GvHD I-II° sowie nach bledem Intervall eine limitierte chronische GvHD, die mit 2-facher Immunsuppression behandelt wurde. Bei Patient JW manifestierte sich das Myelomrezidiv extramedullär. Bis zur letzten Messung wurde keine Therapie eingeleitet. Trotz einer Aspergilluspneumonie und einer CMV-Infektion traten in den ersten drei Monaten nach allogener HSCT keine EpCAM-positiven Zellen auf. Mit Auftreten der chronischen

GvHD konnten dann auch EpCAM-positive Zellen in der Blutzirkulation nachgewiesen werden. In Abb. 19 wird beispielhaft der Verlauf beim Myelom anhand von Daten des Patienten BA gezeigt. Die Therapie des Rezidivs erfolgte mit Bortezomib-Induktion in acht Kursen mit Dosisreduktion (B-Ind.), 23 Kursen Bortezomib-Erhaltungstherapie plus Dexamethason (B-Erhalt.+D), drei Reinduktionzyklen mit Bendamustin, Bortezomib und Dexamethason (Re) sowie zum Schluss fünf Revlimidgaben plus Dexamethason (R+D). Wegen fieberhaften Infekten (Inf) der oberen Atemwege wurden Pausen in den Therapiezyklen eingelegt. Weiterhin ist in der Abb. 19 eine Thrombophlebitis (Phlebitis) und eine Herpes Simplex- Infektion (HSV) zu verfolgen. Um einen eventuellen Zusammenhang der EpCAM-positiven Zellen zu dem Myelom herzustellen, wurden CD138-positive Zellen als Myelom-Marker aufgetragen. Die CD138-positiven Zellen in % stiegen allmählich an, ohne sichtlichen Zusammenhang zu dem Verlauf der EpCAM-positiven Zellen/ml Blut. Gegen Ende der Myelomtherapie schienen die EpCAM-positiven Zellen zu sinken. Zeitgleich waren auch keine CD138-positiven Zellen nachweisbar.



Bei Patient PG wurde die erste Messung erst drei Monate nach der Rezidivdiagnose erhoben, was eine Aussage über eine mögliche Korrelation von EpCAM-positiven Zellen und Myelomrezidiv nicht möglich macht. Er wurde mit einer ähnlichen Therapie wie Patient BA

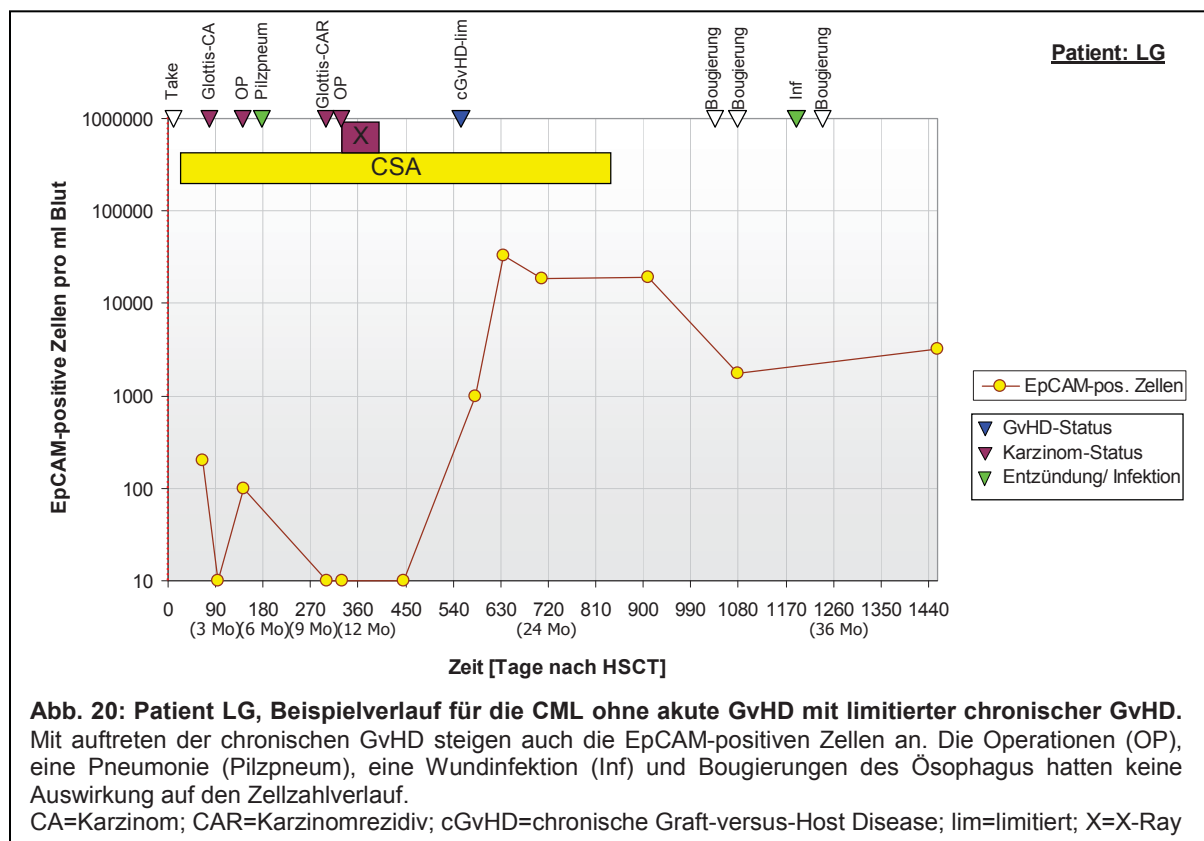
behandelt. Auch bei Patient PG sanken mit der Therapie die EpCAM-positiven Zellen/ml Blut. Dieser Trend wurde auch von einer kleinknotigen Leberzirrhose nicht beeinflusst.

5.5.4 Verläufe bei der CML

Bei 19 Patienten war eine CML Anlass für die allogene HSCT.

Die EpCAM-positiven Zellen erreichten wie beim Myelom ebenfalls ein Plateau, um welches sie verschieden stark schwankten.

3 der 19 Patienten erkrankten nicht an einer akuten GvHD. Patient LG (Abb. 20) entwickelte im Verlauf eine limitierte chronische GvHD. Zeitgleich mit dem Beginn der GvHD stiegen die EpCAM-positiven Zellen an und blieben anschließend auf einem vergleichsweise hohem Niveau. Aufgrund der gut kontrollierten GvHD konnte die Immunsuppression abgesetzt werden, was eine mäßige Reduktion der EpCAM-positiven Zellen zur Folge hatte. Drei Monate nach allogener HSCT wurde bei dem Patienten außerdem ein gut differenziertes Glottiskarzinom (Glottis-CA) diagnostiziert, welches operativ (OP) entfernt wurde. Ein Jahr später rezidierte dieses (Glottis-CAR), woraufhin eine zweite Operation (OP) mit anschließender Bestrahlung (X) folgte. Es konnten keine EpCAM-positiven Zellen weder nach der ersten, noch nach der zweiten Operation nachgewiesen werden. Desweiteren hatten eine Pilzpneumonie (Pilzpneum), eine Wundinfektion (Inf) und Bougienungen des Ösophagus keine Auswirkung auf den Verlauf der EpCAM-positiven Zellen.



Patient VK entwickelte, nach Absetzen der Immunsuppression auf Grund eines CML-Rezidives, ebenfalls eine limitierte chronische GvHD. Die EpCAM-positiven Zellen stiegen analog zum Verlauf von Patient LG (siehe

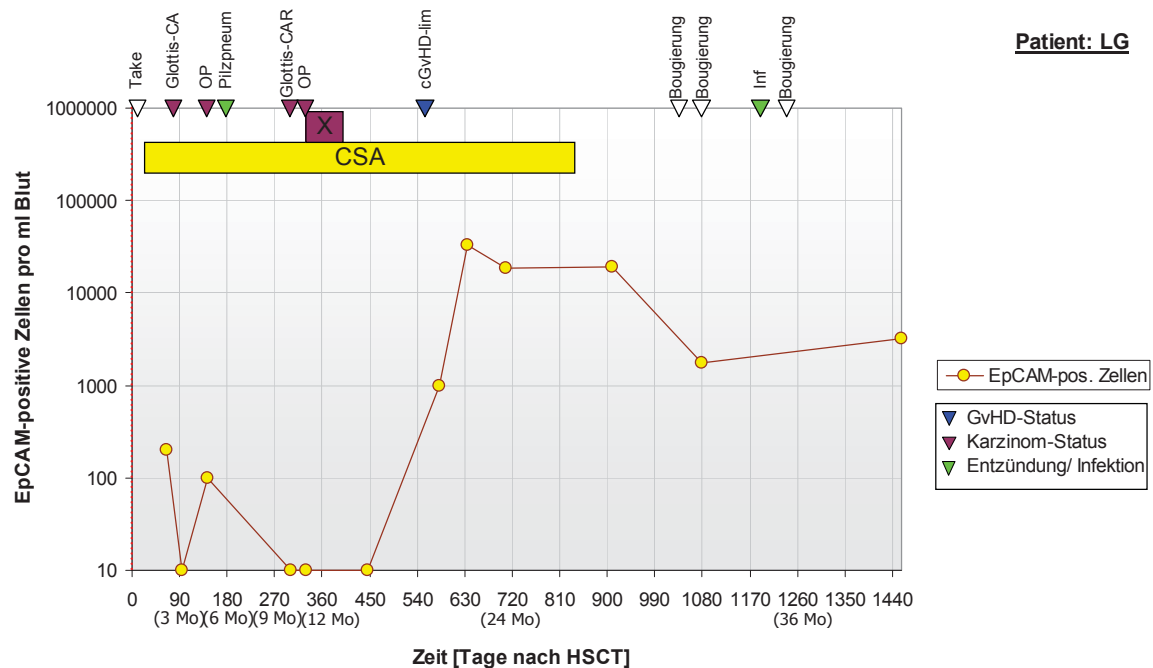
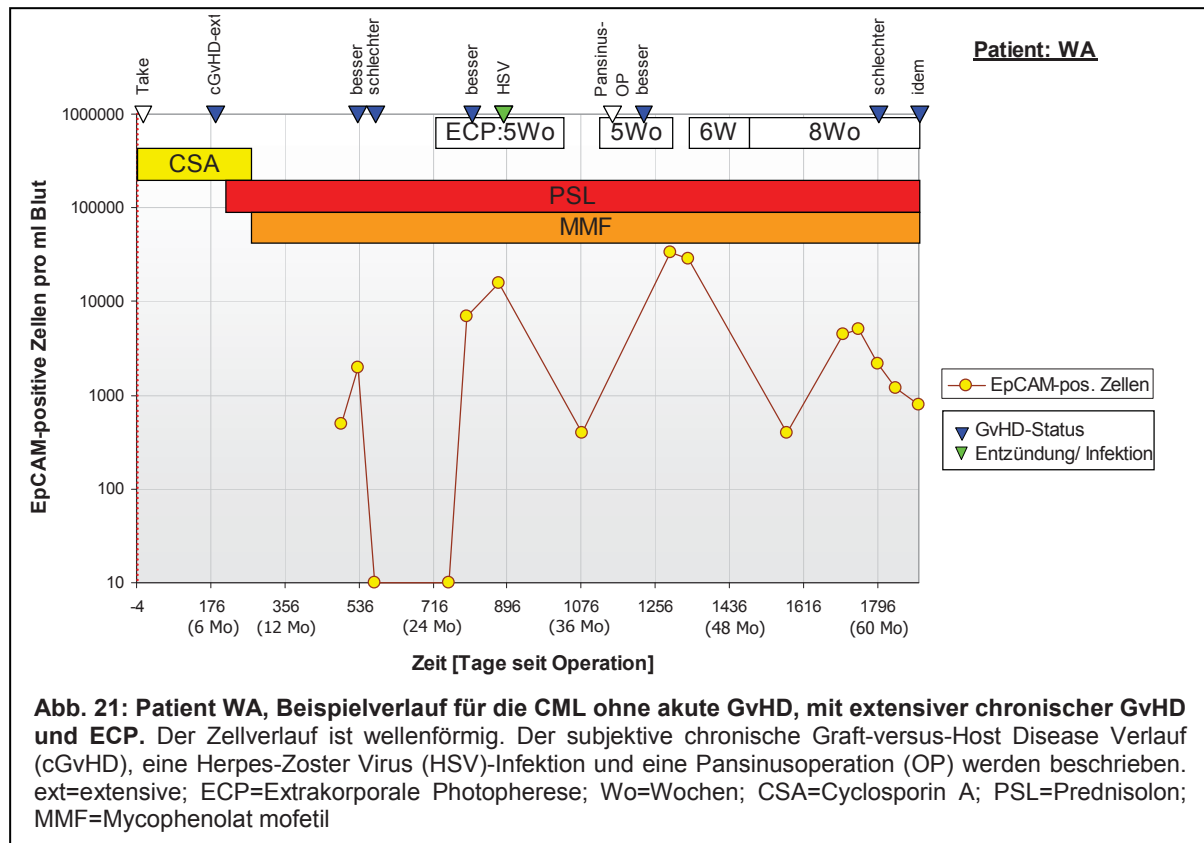
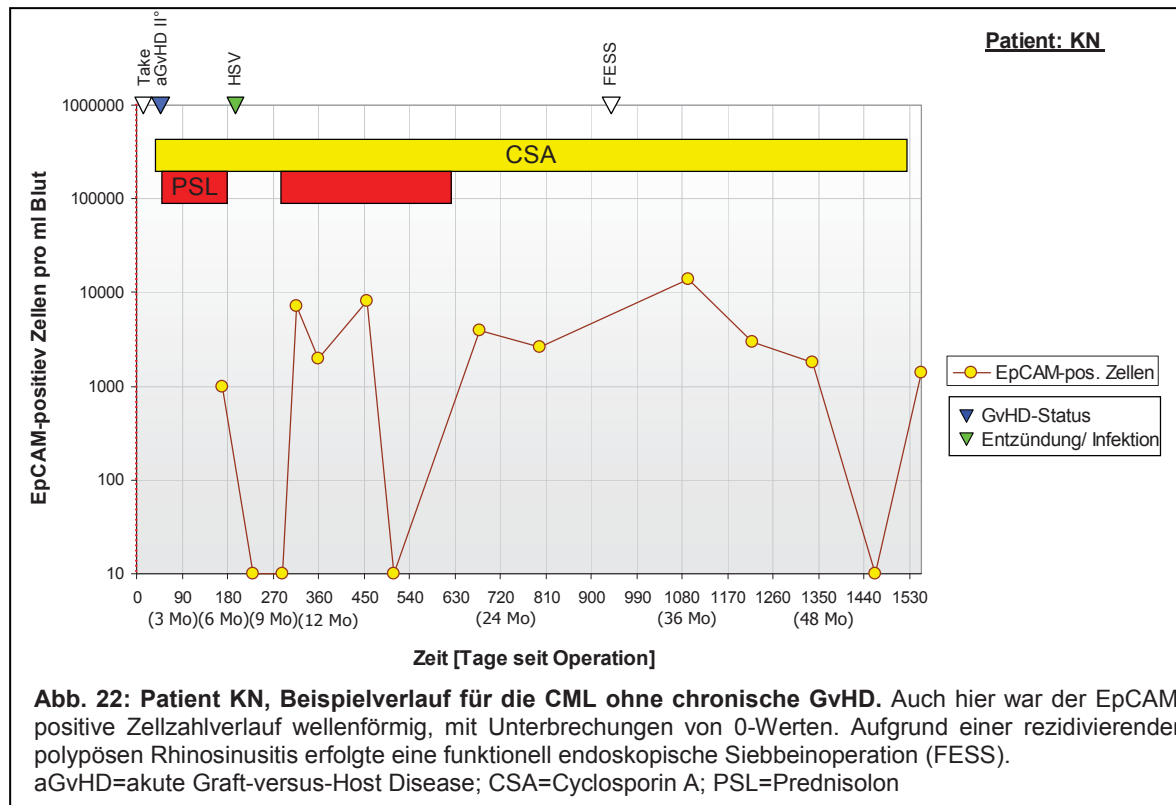


Abb. 20) zeitgleich um das 5-fache an (von 4.000 auf 20.000 Zellen/ml Blut). Patient WA, der hier als ein weiteres Beispiel dargestellt werden soll, erkrankte an einer extensiven Form der chronischen GvHD, welche in Abb. 21 verfolgt werden kann. Die Therapie dieser GvHD erfolgte mit ECP und 2-facher Immunsuppression. Wegen einer chronischen Sinusitis unterzog sich der Patient einer Pansinusoperation. Drei Monate nach diesem Eingriff wurde der Maximalwert EpCAM-positiver Zellen/ml Blut (100-facher Anstieg gegenüber dem Vorwert) gemessen.

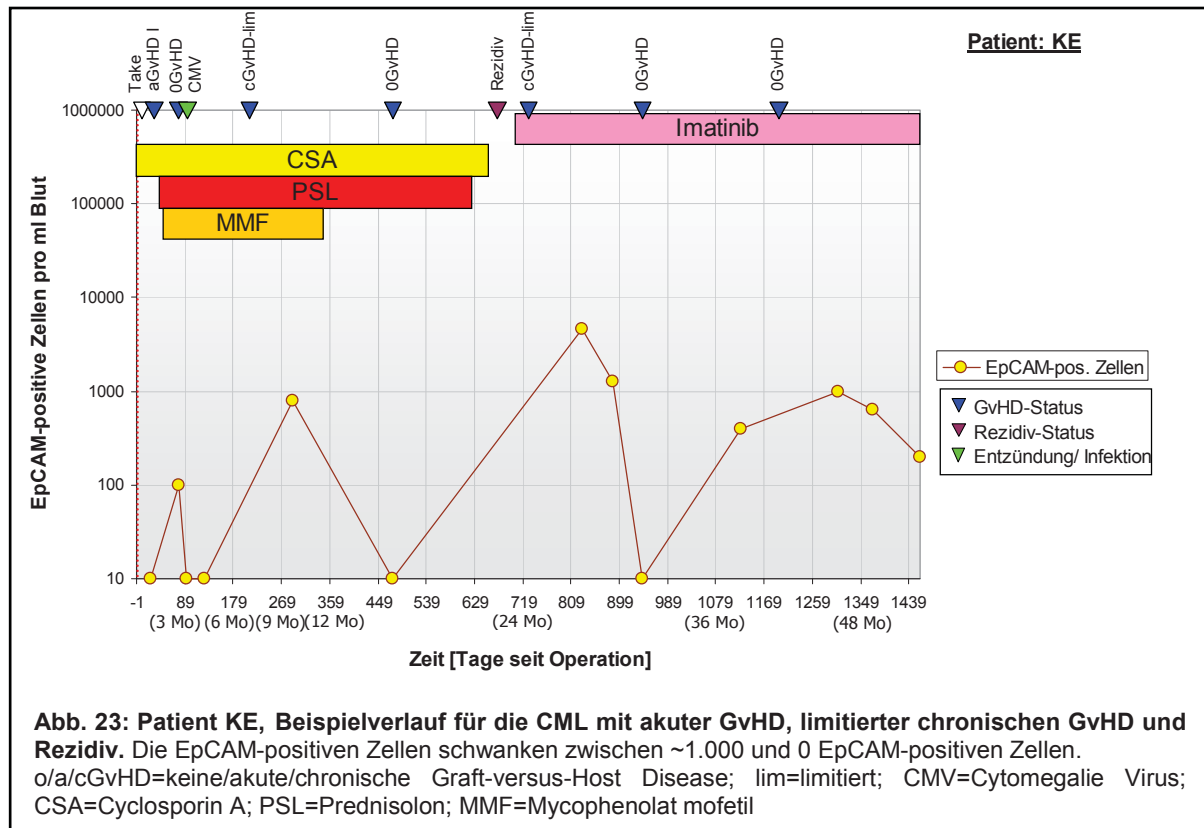


Alle anderen 16 Patienten erkrankten an einer akuten GvHD I-III°, die je nach Schweregrad mit 2- bzw. 3-facher Immunsuppression behandelt wurde. Falls unmittelbar nach HSCT begonnen werden konnte Messdaten zu erheben, ließen sich in dieser Phase keine EpCAM-positiven Zellen nachweisen, stiegen aber spätestens nach sechs Monaten erwartungsgemäß an.

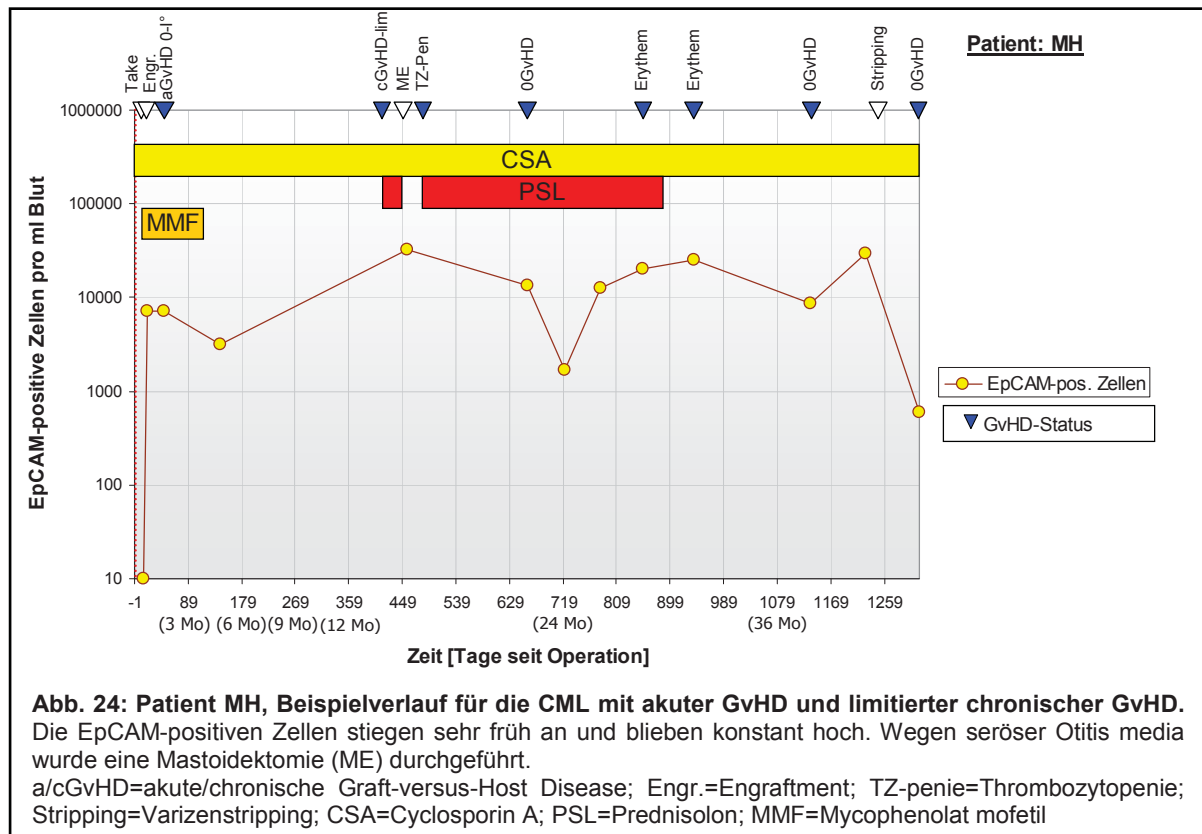
Bei drei der 16 Patienten blieb nach der akuten GvHD eine chronische GvHD aus. Die Zellniveaus waren relativ hoch (8.000-45.000 EpCAM-positive Zellen/ml Blut). Die Immunsuppression konnte durch das Ausbleiben der chronischen GvHD stetig zurückgenommen werden. Klinisch wurde bei allen drei Patienten ein Herpes labiales auffällig. Patient KN zeigt einen exemplarischen Verlauf der EpCAM-positiven Zellen ohne chronische GvHD. Zusätzlich wurde bei ihm auf Grund einer polypösen Rhinosinusitis eine funktionelle endoskopische Siebbeinoperation (FESS) durchgeführt. Die Zellen scheinen, wie schon bei Patient WA (siehe Abb. 21), nach der FESS etwas anzusteigen (Abb. 22).



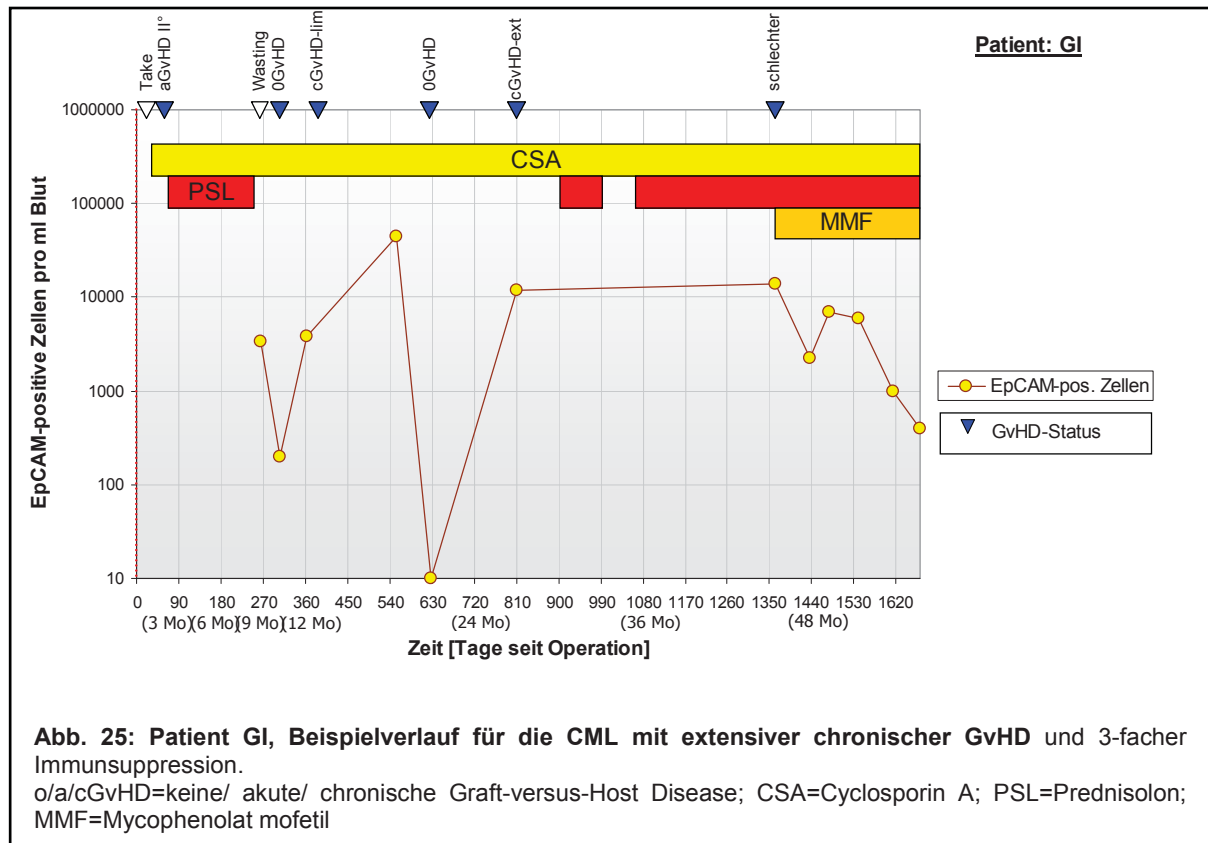
Bei sechs der 16 Patienten ging die akute GvHD unter 2-facher Immunsuppression in eine limitierte chronische GvHD über. Während der akuten GvHD III-IV° blieben die EpCAM-positiven Zellen/ml Blut bei 0. Bei den ersten klinischen Zeichen der limitierten chronischen GvHD waren die EpCAM-positiven Zellen/ml Blut am höchsten (10.000 EpCAM-positive Zellen/ml), doch nicht so hoch wie bei den Patienten, bei denen eine chronische GvHD fehlte. Abb. 23 macht einen solchen Verlauf deutlich. Außerdem kann ein Rezidiv der CML verfolgt werden. Es wurde die Immunsuppression beendet und mit Imatinib therapiert. Nach der Rezidivdiagnose war die höchste Konzentration von EpCAM-positiven Zellen im Blut vorhanden. Unter Therapie kam es zu einem Abfall bis auf zeitweise 0 EpCAM-positive Zellen/ml.



Die EpCAM-positiven Zellen blieben bei Patient FK während der akuten GvHD ebenfalls niedrig (200 EpCAM-positive Zellen/ml) und stiegen erst nach sechs Monaten wie erwartet an (9184 EpCAM-positive Zellen/ml). Neben der GvHD war bei diesem Patienten noch eine ERCP ohne Zellanstieg und eine Cholezystektomie erfolgt, woraufhin die EpCAM-positiven Zellen von 600/ml auf 2128/ml Blut anstiegen. Bei Patient MH stiegen die EpCAM-positiven Zellen schon vor der klinischen Manifestation der akuten GvHD 0-I° stark an (7200 Zellen/ml Blut). Zu diesem Zeitpunkt wurde lediglich wegen eines Engraftmentsyndroms (Engr.) 2-fach immunsupprimiert. Im Verlauf musste zeitweise mit Prednisolon eine Thrombozytopenie (TZ-penie) therapiert werden. Sonst erfolgte eine kontinuierliche Reduktion der Immunsuppressiva. Bis auf ein zeitweise diskretes Erythem zeigten sich keine klinischen Zeichen einer chronischen GvHD. Eine Woche vor dem Maximalwert von 32.096 EpCAM-positiven Zellen/ml Blut (10-facher Abstieg gegenüber dem Vorwert) unterzog sich der Patient einer Mastoidektomie (ME) wegen akut seröser Otitis media. Ein späteres Varizenstripping (Stripping) verursachte keinen Zellanstieg (Abb. 24).



Bei sieben Patienten äußerte sich die chronische GvHD durch einen extensiven, schubförmigen Verlauf. Diese wurde mit einer individuell angepassten 2- bzw. 3-fachen Immunsuppression und je nach Erfordernis zusätzlich mit ECP therapiert (Beispielverläufe mit ECP-Therapie siehe Abb. 17 und 21). Während der besonders aktiven GvHD-Schüben waren in der Regel bei extensiver Ausprägung weniger EpCAM-positive Zellen/ml Blut nachweisbar als bei limitierter GvHD. Patient KA fiel aus diesem Schema und zeigte trotz extensiver GvHD hohe EpCAM-positive Zellzahlen/ml Blut (~10.000 Zellen/ml). Klinisch fiel dieser Patient gleichzeitig mit einer Sigmoiditis und Lymphadenitis auf. Der EpCAM-positive Zellverlauf bei extensiv chronischer GvHD wurde exemplarisch bei dem Patienten GI veranschaulicht. Anfänglich blieb die chronische GvHD limitiert. Im Verlauf verschlechterte sich der GvHD-Status im Sinne einer extensiven GvHD. Die extensive chronische GvHD flammte dabei immer bei Reduktion der Immunsuppression auf, sodass additiv mit MMF immunsupprimiert wurde. Mit Zunahme der GvHD-Aktivität und verstärkter immunsuppressiver Therapie ließen sich sukzessiv weniger EpCAM-positive Zellen/ml Blut nachweisen (Abb. 25).



Es ist festzuhalten, dass keine wesentlichen Unterschiede im Verlaufsbild der EpCAM-positiven Zellen ohne akute GvHD im Vergleich zu den Verläufen mit akuter GvHD erkennbar waren.

6 DISKUSSION

EpCAM, ein Calcium-unabhängiges, epitheliales Zell-Adhäsions-Molekül, wurde ursprünglich als ein spezifisches Antigen bezeichnet, das sich ausschließlich auf epithelialen Zellen finden lässt (Litvinov et al. 1994, Moldenhauer et al. 1987). Dabei waren die Forschungen besonders auf maligne Tumore fokussiert. Da EpCAM besonders auf Karzinomzellen über-

de novo-exprimiert wird, kann es dabei als diagnostisches Mittel und Target für neue Therapien dienen (Went et al. 2004).

Ziel dieser Arbeit war es zu zeigen, dass EpCAM-positive Zellen in der menschlichen Blutzirkulation nicht ausschließlich zirkulierende Tumorzellen darstellen. Es konnte gezeigt werden, dass diese Zellen auch nach allogener HSCT regelhaft im peripheren Blut nachweisbar waren. Durch zeitlichen Vergleich der quantitativen Zellzahlverläufe zu klinischen Ereignissen nach allogener HSCT sollten Hypothesen zum Zusammenhang des Auftretens dieser im peripheren Blut ungewöhnlichen Zellart mit immunologischen Mechanismen nach Transplantation generiert werden.

Es wurden 35 Patienten nach allogener HSCT auf EpCAM-positive Zellen im zirkulierenden Blut untersucht. Mit Hilfe der Krankenakten wurden retrospektiv klinische Ereignisse herausgearbeitet, welche mögliche Ursachen der Zellausschwemmung darstellen können. Dazu zählten die GvHD-Entwicklung und die immunsuppressive Therapie sowie andere Ereignisse wie Rezidive der Grunderkrankung, operative Eingriffe und schwere Infektionen.

6.1 Nachweis EpCAM-positiver Zellen im zirkulierenden Blut

EpCAM-positive Zellen sind nicht regelhaft in der Blutzirkulation nachzuweisen. Sie werden jedoch bei Patienten mit epithelialen Tumoren beschrieben, am häufigsten bei Lungen-, Brust- und Kolonkarzinomen (Moldenhauer et al. 1987, Went et al. 2004). Diese zirkulierende EpCAM-positive Zellen wurden als disseminierte Tumorzellen interpretiert (Chaubal et al. 1999).

Im Knochenmark von Tumorpatienten machen EpCAM-positive Zellen einen Anteil von etwa 10^{-3} - 10^{-7} der gesamten Zellen aus, im peripheren Blut etwa einen Anteil von 10^{-3} - 10^{-8} (Pachmann et al. 2001, Riethmueller et al. 1996). Somit ist eine sehr sensitive Nachweismethode nötig, die unter einer großen Zahl EpCAM-negativer Zellen eine EpCAM-positive Zelle erkennt. Peripheres Blut wird als Probematerial auf Grund der einfachen Verfügbarkeit sowie geringerer Risiken und Belastungen bei der Abnahme im Vergleich zum Knochenmark bevorzugt.

Der Nachweis EpCAM-positiver Zellen im peripheren Blut ist zum einen immunzytochemisch möglich. Dieses Verfahren ist sehr zeitaufwendig, da große Zahlen normaler Blut- oder Knochenmarkzellen gescreent werden müssen (Pantel et al. 1994). Zum anderen steht mit der PCR eine sehr sensitive Methode zur Verfügung. Allerdings eignet sich diese Methode nicht zur quantitativen Bestimmung von EpCAM-positiven Zellen, sondern wird für qualitative Analysen der vorher detektierten EpCAM-positiven Zellen angewandt (Fehm et al. 2009). Daneben kann die Laser Scanning Cytometry (LSC) zum Einsatz kommen, welche bereits zur standardisierten Quantifizierung EpCAM-positiver Zellen bei Lungen- und Brustkrebspatienten genutzt wird (Pachmann et al. 2001). Bei der Bestimmung von zirkulierenden Tumorzellen mit LSC wird die Schnelligkeit der Flusszytometrie mit der mikroskopischen Beurteilung jeder einzelnen Zelle kombiniert. Somit werden Analysen von 50.000 Zellen in nur 30 min möglich. Dabei wird eine positive Zelle unter 10^5 Zellen erkannt (Pachmann et al. 2001, Pachmann et al. 2005).

In Voruntersuchungen war aufgefallen, dass bei nicht tumortragenden Kontrollpersonen im Einzelfall zirkulierende EpCAM-positive Zelle im Blut auftreten können, wobei sich bei diesen Personen entzündliche Prozesse mit eventuellem autoimmunologischen Hintergrund nachweisen ließen (K. Pachmann, unpubliziert). Wir stellten dabei die Hypothese auf, dass sich solche Zellen möglicherweise auch im Blut von Patienten nach allogener HSCT nachweisen lassen könnten. Die Frage des Auftretens EpCAM-positiver Zellen im peripheren Blut nach Durchführung einer allogenen HSCT ist bisher noch nicht untersucht. Es findet sich zu diesem Thema keine Literatur in den entsprechenden Datenbanken (PubMed). Daraufhin wurden 35 Patienten mit ALL, AML, Myelom und CML nach allogener HSCT auf das Vorhandensein von EpCAM-positiven Zellen im peripheren Blut gescreent. Dabei konnte festgestellt werden, dass sich mit Verzögerung von drei bis neun Monaten bei 92,6% der Patienten EpCAM-positive Zellen in der Blutzirkulation nachweisen ließen. Da EpCAM-positive Zellen mit dieser Regelmäßigkeit auftraten, sind sie in diesem Fall sicher nicht als disseminierte Tumorzellen zu interpretieren. Die Wahrscheinlichkeit, sekundär an einem EpCAM-positiven Karzinom zu erkranken, liegt nach allogener HSCT bei 7 bis 20% nach 10 bis 15 Jahren (Kröger und Zander 2004). Selbst wenn EpCAM als ein präkanzerogener Marker fungieren würde, wie es von Winter et al. postuliert wird (Winter et al. 2003a), erklärte dies nicht die Häufigkeit des Auftretens und das konstante Niveau der Zellen nach allogener HSCT. Zirkulierende EpCAM-positive Zellen sind folglich nicht in jedem Falle mit zirkulierenden Tumorzellen gleichzusetzen.

6.2 Verlauf der Zellzahlmediane

Um einen ersten Eindruck über den Verlauf der EpCAM-positiven Zellen im Blut nach HSCT zu bekommen, wurde der Verlauf der medianen Zellzahl aller 35 Patienten erstellt (siehe Abb. 10). Der Median hat gegenüber dem Mittelwert den Vorteil, dass er von extremen Werten kaum beeinflusst wird. Deshalb kann der Median bei schiefen, unsymmetrischen Verteilungen, wie die EpCAM-positiven Zellzahlverläufe, besser interpretiert werden (Lange und Bender 2007). Als Streumaße werden dabei 0.25- und 0.75-Quartile sowie die Minimal- und Maximalwerte angegeben.

Zum einen fiel auf, dass die EpCAM-positiven Zellen in den ersten zwei bis drei Monaten nach allogener HSCT, also unter anderem auch in der Aplasiephase direkt nach Transplantation, in der auch die Toxizität der Konditionierung am stärksten ist, in der Zeit des Engraftments und beim Auftreten einer akuten GvHD, nur minimal bzw. überhaupt nicht auftraten. Zum anderen wurde deutlich, dass während der chronischen GvHD die EpCAM-positiven Zellen kontinuierlich anstiegen, um anschließend für lange Zeit auf einem medianen Niveau von über 1.000 EpCAM-positiven Zellen/ml zu bleiben. Doch schienen daneben auch andere Ereignisse zu einem Ausschwemmen der EpCAM-positiven Zellen in die Blutzirkulation zu führen, die dann an Spitzenwerten sichtbar wurden. Die Vorstellung dabei ist, dass durch Gewebeschädigung oder -regeneration, EpCAM-positive Zellen in die Blutzirkulation gelangen und nachgewiesen werden könnten. Solche Gewebeschädigungen könnten durch Operationen, Entzündungen oder Infektionen bedingt sein.

6.3 Korrelation von EpCAM-positiven Zellen und GvHD

Die Auswertung erfolgte retrospektiv, d.h. die Patientenakten wurden nach der Messdatenerhebung auf eventuelle Zusammenhänge der EpCAM-positiven Zellen zum klinischen Geschehen analysiert. Die Datenerhebung konnte somit nicht zielgerichtet zu bestimmten Ereignissen erfolgen. Um dennoch richtungsweisende Vergleiche zu erhalten, wurden zu jedem Patienten die Zahl der EpCAM-positiven Zellen/ml Blut über den gesamten bzw. über einen interessanten Zeitraum ermittelt. Im Einzelnen sind jedoch die EpCAM-positiven Zellverläufe jedes Patienten mit deren Anstiegen und Abfällen zu deuten.

Mögliche Auswirkungen der GvHD auf EpCAM-positive Zellen sollen nun interpretiert und diskutiert werden.

Die Vergleiche der medianen EpCAM-positiven Zellzahlen/ml Blut bei Auftreten der akuten GvHD ließ erkennen, dass keine bzw. nur wenige Zellen nachweisbar waren (siehe Abb. 11 und Abb. 12). Allenfalls bei gering ausgeprägter, akuter GvHD traten wenige EpCAM-positive Zellen/ml Blut im Median auf. Dieser Wert sowie die Beobachtung, dass die 0.75-Quartile und Maximalwerte besonders bei Auftreten einer akuten GvHD bis auf fast 10.000 EpCAM-

positive Zellen/ml Blut reichten machten deutlich, dass im Einzelfall jedoch hohe Zahlen von EpCAM-positiven Zellen im Blut auftreten können. EpCAM-positive Zellen traten damit nicht regelhaft, wohl aber unter besonderen Umständen in den ersten drei Monaten nach allogener HSCT auf.

Bei Langzeitüberwachungen nach allogener HSCT und im Zusammenhang mit der chronischen GvHD (siehe Abb. 13) zeigte sich, dass während der Nachbeobachtungszeit und bei der chronischen GvHD regelhaft EpCAM-positive Zellen auftraten. Besonders bei Patienten, die klinisch keine Zeichen einer chronischen GvHD zeigten und bei limitierter chronischer GvHD waren die Zellzahlen im Median am höchsten. Dieses Ergebnis legt einen Zusammenhang der EpCAM-positiven Zellen mit chronischen Veränderungen nach allogener HSCT und der chronischen GvHD oder deren Auswirkungen nahe.

In dieser Arbeit sollen zwei mögliche Hypothesen über den Ursprung der EpCAM-positiven Zellen diskutiert werden:

1. dass es sich bei den EpCAM- Antigen positiven Zellen um epitheliale Zellen handelt und/oder
2. dass EpCAM- Antigen auf rekonstituierten hämatopoetischen Zellen exprimiert wird.

Dabei stellt sich die Frage, warum EpCAM-positive Zellen nicht während der akuten GvHD, aber während der chronischen GvHD regelhaft nachweisbar waren.

6.3.1 EpCAM als Antigen auf Epithelzellen

Wie bereits erläutert, handelt es sich in diesem Rahmen bei den EpCAM-positiven Zellen im peripheren Blut eher nicht um zirkulierende Tumorzellen. Zirkulierende EpCAM-positive Zellen müssen also bei Patienten nach allogener HSCT über andere Mechanismen in die Blutbahn gelangen.

Es gibt die Behauptung, dass EpCAM-positive Zellen in gesunden Organen Stammzellen darstellen könnten (Stingl et al. 2001, Jozefczuk et al. 2009, Gargett et al. 2009). Diese multipotenten Stammzellen sind die Grundlage für Organregeneration. Zudem ziehen Reorganisationsprozesse nach Organschädigung eine Überexpression an EpCAM nach sich (Trzpis et al. 2007). Es existieren außerdem Daten über die Steigerung der EpCAM-Expression bei Entzündungen der Leber und der Niere sowie über den Nachweis zirkulierender EpCAM-positiver Zellen nach entzündlichen Prozessen wie Verbrennungen, entzündlichen Darmerkrankungen mit vermutlicher Anlage zu autoimmunologischen Krankheiten und nach Operationen (Trzpis et al. 2007, K. Pachmann, unpubliziert). Kürzlich wurden auch Patientinnen vor und nach Mammographie auf zirkulierende EpCAM-positive Zellen untersucht. Dabei waren nach Mammographie EpCAM-positive Zellen in ähnlichen

Größenordnungen wie in dieser Arbeit in der Blutzirkulation nachweisbar gewesen. Erstaunlicherweise konnten EpCAM-positive Zellen noch ein Jahr später detektiert werden (K. Pachmann, unpubliziert).

Denkbar wäre, dass EpCAM-positive Zellen zum einen durch Gewebeschäden in die Blutbahn gelangen, ohne dabei zerstört zu werden. Entgegen der Meinung, dass gesunde, epitheliale Zellen sofort eliminiert werden, sobald sie ihren Zellverband verlassen bzw. in die Blutbahn gelangen, haben Podsypanina et al. über längere Zeit nach Injektion untransformierte, Brustdrüsenepithelzellen in der Lunge nachgewiesen (Podsypanina et al. 2008). Immunologische Schäden während der GvHD könnten über den Verlust von Zell-Zell-Adhäsion zum Loslösen intakter, EpCAM-positiver Zellen aus dem Zellverband führen. Bei inflammatorischen Prozessen und Karzinomen kann zudem die Induktion einer Apoptose, welche normalerweise bei Verlust der Zellkontakte eingeleitet wird, gestört sein, so dass diese Zellen erhalten blieben. (Fouquet et al. 2004). Diese „freien“ EpCAM-positiven Zellen könnten dann passiv mit der Gewebsflüssigkeit abtransportiert werden und so in die Blutzirkulation gelangen. Besonders bei entzündlichen Prozessen wie der GvHD kommt es zu einem „capillary leak“, welches den Durchtritt EpCAM-positiver Zellen in den Blutkreislauf erleichtern könnte (Tichelli und Gratwohl 2008). Die losgelösten EpCAM-positiven Zellen könnten analog zur Metastasierung auch sekundär über die Lymphflüssigkeit in die Blutzirkulation gelangen.

Ein wichtiger Aspekt stellt in diesem Zusammenhang die Tatsache dar, dass EpCAM auf regenerierenden Zellen überexprimiert werden kann (de Boer et al. 1999). Für Geweberegeneration sind nicht nur die EpCAM-vermittelten Zell-Zell-Adhäsionen essenziell, sondern auch die EpCAM-vermittelten Signale zur Zelldifferenzierung, -proliferation, und -migration (Shiah et al. 2008, Mätzkel et al. 2008). Diese Zellen, als Ausdruck von Geweberegeneration, könnten in die Blutbahn gelangen. Daher könnten zirkulierende EpCAM-positive Zellen nicht nur Ausdruck von Gewebeschädigung sein, sondern auch von Heilungsprozessen.

Eine andere Erklärung für EpCAM-positive Zellen in der Blutbahn könnte die Epitheliale-Mesenchymale-Transition (EMT) liefern. Die EMT wird durch Epithelzellen, welche sich phänotypisch in Richtung mesenchymaler Zellen transformieren, charakterisiert. EMT wird unter anderem bei chronischen Entzündungszuständen mit fibrotischem Umbau, wie der chronischen GvHD beobachtet (Kalluri und Neilson 2003, Ogawa et al. 2009). Dazu lösen sich Epithelzellen über den Verlust der E-Cadherin Bindungen aus dem Zellverband und können nun aktiv in das Interstitium migrieren, um dort extrazelluläre Matrix zu synthetisieren (Guarino et al. 2009). Fibrotischer Umbau, welcher die chronische GvHD charakterisiert, könnte durch die EpCAM-vermittelte Schwächung der E-Cadherin Bindung (Litvinov et al. 1997) begünstigt werden. Zudem könnten diese Zellen nun aktiv in die Blutzirkulation migrieren. Nach bisherigem Kenntnisstand sind jedoch mesenchymale Zellen EpCAM-

negativ (Moldenhauer et al. 1987). Durch bestimmte Reize der EMT könnte EpCAM eventuell auf den Zellen erhalten bleiben oder die nachgewiesenen zirkulierenden EpCAM-positiven Zellen stellen eine Art Zwischenstadium des Prozesses von epithelialer zur mesenchymaler Zelle dar.

In diesem Zusammenhang muss die bereits dargelegte Zellzahldynamik in Abhängigkeit zur GvHD diskutiert werden.

Basierend auf dem Konzept des Zytokinsturms, als Ursache der akuten GvHD, führen Schädigungen des Darmepithels durch Konditionierung sowie die neutropenische Transplantationsphase zur Freisetzung von Zytokinen wie TNF- α oder IL-1. Diese stimulieren alloreaktive Immunvorgänge z.B. über die Überexpression von HLA-I und -II. Die dadurch aktivierten Th-1-Lymphozyten, NK-Zellen, Monozyten und zytotoxischen T-Zellen sezernieren ebenfalls Zytokine wie TNF- α oder IL-1 (Jakobsohn und Vogelsang 2007, siehe Abb. 3). TNF- α kann wiederum über NF- κ -B die EpCAM-Expression negativ beeinflussen (Gires et al. 2001). Somit könnte man über dieses Konzept des Zytokinsturmes und den Einfluss von TNF- α erklären, warum keine bzw. nur wenige EpCAM-positive Zellen während der akuten GvHD auftreten. Eine andere Erklärung für das Fehlen EpCAM-positiver Zellen während der akuten GvHD könnte der Sachverhalt der unterschiedlichen pathogenetischen Mechanismen bei akuter und chronischer GvHD sein. Während die akute GvHD von den bereits erwähnten Mechanismen geprägt wird, beruht die chronische GvHD besonders auf der Reaktion der Th2-Zellen. Denkbar wäre eine immunologische Zerstörung EpCAM-positiver Zellen im zirkulierenden Blut während der akuten GvHD. Mit Abnahme der akuten GvHD-Aktivität fallen auch die eben beschriebenen immunologischen Prozesse geringer aus, sodass bei gering ausgeprägten akuten GvHD durchaus EpCAM-positive Zellen nachweisbar sein könnten (siehe Abb. 12). D.h. es würde nur eine Teilzerstörung der EpCAM-positiven Zellen stattfinden, egal ob von Gewebeschäden oder -regeneration stammend. Die Hypothese der EpCAM-positiven Zellausschwemmung als Folge der EMT würde das Fehlen EpCAM-positiver Zellen in der akuten GvHD damit erklären, dass die akute GvHD eher als eine akute, inflammatorische Reaktion imponiert, deren Endeffekte weniger Fibrosen, sondern Zellapoptosen sind.

Eine immunologische Zerstörung der EpCAM-positiven Zellen in der Blutbahn oder noch vor Eintritt in die Blutbahn ist auch bei zunehmender chronischer GvHD vorstellbar. Bei extensiver GvHD treten Heilungsprozesse und Reorganisation zu Gunsten Gewebeschädigung mit fibrotischem Umbau des noch intakten Gewebes in den Hintergrund. Dies könnte zur Folge haben, dass bereits die EpCAM-(Über-)Expression als Zeichen der Geweberegeneration im Gewebe gestört ist und damit bei extensiver GvHD weniger EpCAM-positive Zellen in der Blutbahn nachzuweisen sind. Umgekehrt bedeutet dies, dass bei guter Geweberegeneration (d.h. keine oder nur limitierte chronische GvHD) mehr

EpCAM-positive Zellen in der Blutzirkulation nachweisbar wären. Nimmt man die EMT als Mechanismus für die EpCAM-positive Zellausschwemmung an, könnte mit zunehmender Intensität der chronischen GvHD der Reiz zur aktiven Zellmigration in die Blutbahn unterdrückt werden. Die Zellen blieben im Interstitium hängen und synthetisieren extrazelluläre Matrix.

6.3.2 EpCAM als Antigen auf hämatopoetischen Zellen

Entgegen der früheren Annahme, dass EpCAM nur auf Epithelzellen nachzuweisen sei, liegen einige Forschungsergebnisse vor, in denen gezeigt werden konnte, dass EpCAM auch auf hämatopoetischen Zellen exprimiert werden kann (Bergsagel et al. 1992, Borkowski et al. 1996, Nelson et al. 1999, Lammers et al. 2002).

Lammers et al. identifizierten, EpCAM als einen spezifischen Marker der frühen Erythropoese im Knochenmark (Lammers et al. 2002). Reife Erythrozyten hingegen sind EpCAM-negativ. Es gibt aber keinen Anhalt dafür, dass bei der GvHD regelmäßig sehr unreife EpCAM-positive Erythrozytenvorläufer in die Blutzirkulation ausgeschwemmt werden. Daher ist es eher unwahrscheinlich, dass es sich bei den im Rahmen dieser Arbeit gefundenen, EpCAM-positiven Zellen um sehr unreife Erythrozytenvorläufer handelt.

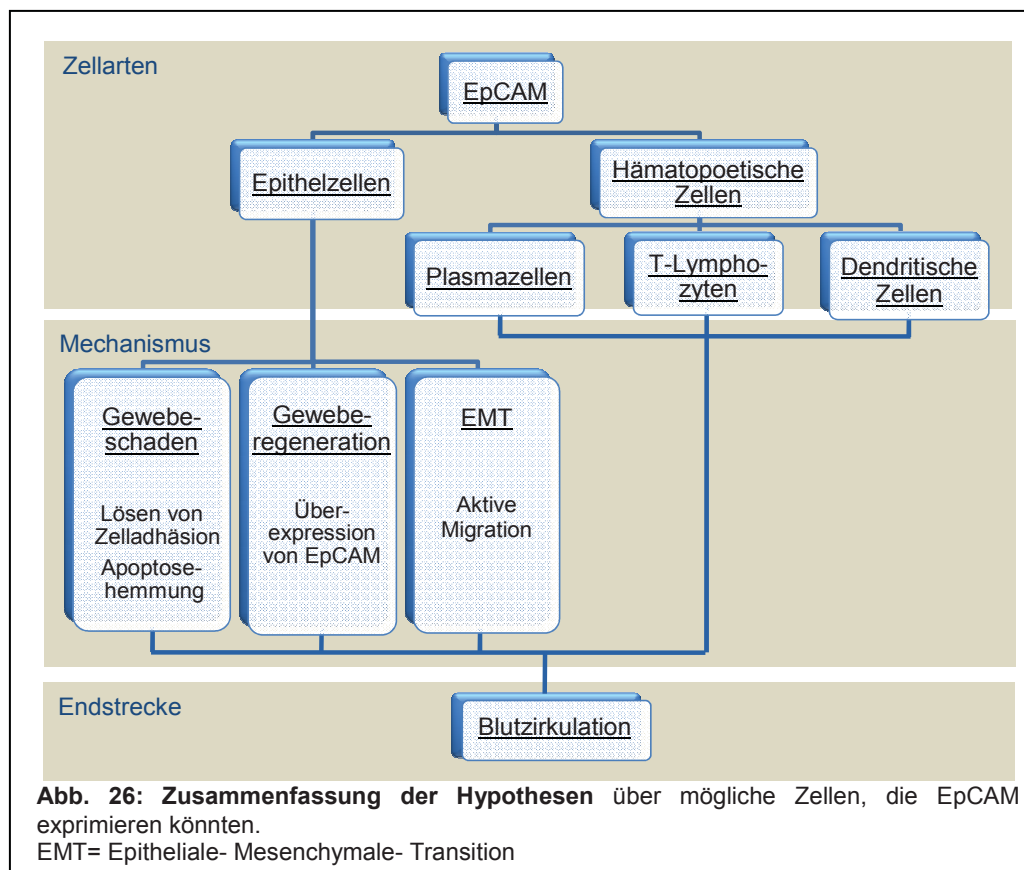
Reife Lymphozyten sind ebenfalls EpCAM-negativ, allerdings wird von Einzelfällen berichtet, in denen EpCAM auf murinen Plasmazellen und humanen T-Zellenreihen nachweisbar waren. B-Lymphozyten und deren Vorläufer waren hingegen EpCAM-negativ. Plasmazellen und Epithelzellen stehen in enger Verbindung miteinander. Besonders für den Gastrointestinaltrakt postulierte Bergsagel et al. den Einfluss von EpCAM für die immunologische Barriere (Bergsagel et al. 1992). Nach allogener HSCT könnten B-Lymphozyten verstärkt zu EpCAM-positiven Plasmazellen aktiviert werden, um dieser Funktion gerecht zu werden. Die EpCAM-Expression auf T-Lymphozyten erklärte man sich als eine aberrante Reifung, währenddessen in normalen T-Lymphozyten die EpCAM-Expression gehemmt wird (Bergsagel et al. 1992). Naive T-Zellen mit einem breiten TCR-Repertoire benötigen die Reifung im Thymus. Fehlmechanismen der positiven und negativen Selektion können zur Bildung autoreaktiver T-Lymphozyten führen, welche ursächlich für Autoimmunkrankheiten sein können (Taguchi et al. 1999). Derartige autoreaktive Lymphozyten führen auch bei der chronischen GvHD zu autoimmunähnlichen Symptomen (Lee et al. 2003, Luft et al. 2007, Sherer und Shoenfeld 1998). In diesem Zusammenhang ist eine Studie von Nelson et al. zu nennen, in der murines EpCAM besonders an den Stellen der Thymozyten und dem Thymusepithel des Markes nachweisbar war, an denen diese im engen Kontakt miteinander stehen. Folglich scheint EpCAM wichtig für den Reifungsprozess von Thymozyten zu T-Lymphozyten zu sein (Nelson et al. 1996, Moldenhauer et al. 1987, Winter et al. 2003a). Es wäre denkbar, dass die zirkulierenden EpCAM-positiven Zellen

aberrante T-Zellen, z. B. autoreaktive Lymphozyten, die zum Bild der chronischen GvHD beitragen, darstellen. Dabei korreliert der zeitliche Verlauf der zirkulierenden EpCAM-positiven Zellenzahlen -welche nach neun bis zwölf Monaten im Median das Plateau erreicht haben- mit der B- und T-Lymphozytenrekonstitution, welche nach sechs bis 24 Monaten abgeschlossen ist (Lum 1987, Pavletic et al. 1998). Eine weitere Begründung für das Ausbleiben EpCAM-positiver Zellen während der akuten GvHD unter der Hypothese „autoreaktive, EpCAM-positive T-Lymphozyten“ wäre, dass während der akuten GvHD viele Vorläufer-T-Lymphozyten in Apoptose gehen (Krenger und Holländer 2008). Die akute GvHD schwächt die T-Zell-Rekonstitution durch Defekte der Thymopoese und führt auf diese Weise zu Veränderungen des T-Zellkompartiments. Nur bei akuter, nicht aber bei chronischer GvHD reduziert sich daher das Thymus-Lymphozyten-Repertoire. (Krenger und Holländer 2008, Sherer und Shoenfeld 1998). Solche „autoreaktiven, EpCAM-positiven Lymphozyten“ könnte daher erst später entstehen und in der Blutzirkulation nachgewiesen werden. Die Tatsache, dass weniger EpCAM-positive Zellen bei extensiver als bei limitierter, chronischer GvHD nachweisbar waren, könnte durch die stärkere Thymusschädigung bei extensiver GvHD erklärt werden. Dabei würde bereits die Reifung solcher eben beschriebener „EpCAM-positiver, autoreaktiver T-Lymphozyten“ gestört sein. Zudem nehmen lymphotoxische Effekte immunsuppressiver Therapie auf die B- und T-Lymphozyten Einfluss (Sarantopoulos et al. 2007). Mit zunehmender GvHD-Schwere und steigender Immunsuppression ließen sich demnach weniger solcher postulierter „EpCAM-positiver Lymphozyten“ nachweisen. Jedoch konnten im Median die meisten EpCAM-positiven Zellen ohne Auftreten einer chronischen GvHD nachgewiesen werden. Dies würde eher gegen die These autoreaktiver, EpCAM-positiver T-Lymphozyten sprechen. EpCAM-positive Plasmazellen hingegen könnten ein Indikator für den Ausbau und die Aufrechterhaltung mukosaler Barrierefunktion sein, die ohne chronische GvHD und ohne medikamentöse Immunsuppression relativ ungestört bliebe. Der Hypothese, dass EpCAM auf aberranten Lymphozyten exprimiert werden könnte, ist entgegen zu halten, dass die EpCAM-positiven Zellen bezüglich des Lymphozytenmarkers CD45-negativ waren. Dabei existieren eine Vielzahl an Isoformen des CD45-Moleküls (Hermiston et al. 2003). Eine mangelnde bzw. fehlende Expression von CD45 ist dabei mit Immundefiziten und Autoimmunkrankheiten verbunden (Byth et al. 1996, Kung et al. 2000, Tchilian und Berverley 2006). Daher kann man vermuten, veränderte oder fehlende CD45-Moleküle bei chronischer GvHD zu finden. Zwar bindet CD45-PE, welches zur LSC-Messung verwendet wird, die meisten Epitope der verschiedenen Isoformen des CD45. Granulozyten schwach und Lymphozyten sind stark orange-positiv. Zusätzlich können andere Zellen leicht orange fluoreszieren. Diese schwache Farbgebung ist jedoch als unspezifisch zu deuten (Miltenyi Biotec). Ein möglicher Grund, weshalb die Zellen unter dem

Mikroskop nicht stark orange fluoreszieren, könnte die fehlende Erkennung von seltenen Isoformen, fehlerhaftem oder fehlendem CD45 sein.

Auch muss der Nachweis von EpCAM auf Dendritischen Zellen (DC) diskutiert werden. Borkowski et al. konnten EpCAM auf murinen Langerhans-Zellen der Haut und auf DC in deren assoziierten Lymphknoten nachweisen (Borkowski et al. 1996, Nagao et al. 2009). DC sind in der Lage, aktiv zu migrieren. Damit ist es prinzipiell möglich, dass EpCAM-positive DC in die Blutbahn gelangen können. Die genaue Funktion dieser EpCAM-positiven DC ist weitgehend unklar. Antikörper gegen EpCAM hemmen nicht die DC-induzierte Proliferation von naiven T-Lymphozyten (Borkowski et al. 1996). DC spielen bei der akuten wie auch der chronischen GvHD eine wichtige Rolle (Wilson et al. 2009, Orti-Raduan et al. 2009). Die Dynamik der EpCAM-positiven Zellen wäre zum einen mit den bereits erläuterten Argumenten erklärbar: während akuter und zunehmend chronischer GvHD-Schwere werden die EpCAM-positiven Zellen durch GvHD-assoziierte immunologische Prozesse bzw. durch Immunsuppressiva zerstört. Zum anderen können DC nicht nur eine Immunantwort induzieren, sondern auch diese hemmen oder verhindern (Daniel 2008). Dass heißt, bestimmte DC-Subpopulationen können die GvHD unterdrücken. EpCAM könnte als Antigen auf den DC-Subpopulationen exprimiert werden, die eine immunsuppressive Antwort auslösen. Folglich könnte man ohne bzw. bei geringer chronischer GvHD mehr EpCAM-positive Zellen nachweisen, als bei ausgeprägter GvHD.

In diesem Rahmen kann weder eine Entscheidung über, noch deren Beweis für die Herkunft der EpCAM-positiven Zellen geliefert werden. Es konnte auch sein, dass sich die geschilderten Beobachtungen überlagern. Demnach könnten EpCAM-positive Zellen aus verschiedenen Zellpools in die Blutzirkulation gelangen. Abb. 26 soll noch einmal einen Überblick über die diskutierten Hypothesen geben.



6.4 Korrelation EpCAM-positiver Zellen und medikamentöse Immunsuppression der chronischen GvHD

Bei Überlegungen zu der Hypothese „EpCAM als Antigen auf Lymphozyten“ und den Nachweis von EpCAM-positiven Zellen besonders bei chronischer GvHD wird muss auch die Therapie der chronischen GvHD in diese Überlegungen einbezogen werden. Ziel immunsuppressiver Therapie der chronischen GvHD ist es, Lymphozyten zu schädigen, um die GvHD zu minimieren. Für die Tatsache, dass EpCAM-positive Zellen bei Patienten ohne Immunsuppression in bedeutend höherer Zahl im Blut nachweisbar waren als bei Patienten ohne Immunsuppression (siehe Abb. 14), gibt es zwei Erklärungen.

1. „EpCAM auf Epithelzellen“: Bei fehlender oder limitierter chronischer GvHD kann die Immunsuppression reduziert oder abgesetzt werden, d.h. es werden weniger Lymphozyten geschädigt. Diese aktiven, Spenderlymphozyten könnten so das Zielgewebe intensiver schädigen, was wiederum zur Freisetzung EpCAM-positiver Zellen aus den Geweben führen könnte. Bei extensiver chronischer GvHD sind, trotz erhöhter Immunsuppression die Gewebeschäden größer sind als bei limitierter GvHD. Man würde dann noch mehr EpCAM-positive Zellen als Zeichen des Gewebeschadens bei starker chronischer GvHD erwarten außer, wenn die freigesetzten Zellen sofort zerstört werden. Andererseits könnten die Zellen, wie bereits besprochen, auch Ausdruck verstärkter Geweberegeneration sein.

2. „EpCAM-Expression auf Lymphozyten“: Durch den fehlenden oder verminderten lymphotoxischen Effekt der Immunsuppressiva könnten auch mehr „EpCAM-positive Lymphozyten“ zirkulieren. Unsere Daten deuten darauf hin, dass eine medikamentöse Immunsuppression mit einer verminderten Zahl zirkulierender epithelialer Zellen einherging unabhängig davon, wie stark diese ausfiel.

6.5 Korrelationen von Krankheitsentität und Zellzahlverlauf der EpCAM-positiven Zellen

Den Zusammenhang der verschiedenen Krankheitsentitäten mit dem Auftreten EpCAM-positiver Zellen zeigt Abb. 15 mit den medianen Zellzahlverläufen für Patienten mit ALL, AML, multiplem Myelom und CML. Im Allgemeinen wichen die EpCAM-positiven Zellzahlverläufe nicht wesentlich voneinander ab. Bei den individuellen Verläufen der Patienten in Korrelation zum klinischen Verlauf zeigten sich einzelne Spitzenwerte, die nicht mit der GvHD erklärbar waren. Daher wurde versucht, neben dem GvHD-Verlauf andere klinische Ereignisse, z.B. Entzündungen, Operationen und andere Infektionen dem Auftreten von EpCAM-positiven Zellen im peripheren Blut der Patienten zu zuordnen.

6.5.1 Verläufe bei der ALL

Bei der ALL-Gruppe zeigt einer der vier Patienten, Patient BC (siehe Abb. 16), das während der akut toxischen Phase keinen Anstieg der EpCAM-positiven Zellen zu erwarten war. Dieser Verlauf untermauert die Beobachtungen, dass die akute GvHD keinen bzw. wenig Einfluss auf die Zahl EpCAM-positiver Zellen im Blut hat. Auch ein Rezidiv der ALL oder eine CMV-Infektion schien keine Änderung der Zellzahlhöhe auszulösen.

Patienten, bei denen ein längerer Beobachtungszeitraum möglich war, imponierten dagegen mit temporären Spitzenwerten (siehe Abb. 17). Während der limitierten chronischen GvHD stiegen die EpCAM-positiven Zellen/ml an, um dann mit der Weiterentwicklung zur extensiven chronischen GvHD und verstärkten Immunsuppression zu fallen. Für diese Dynamik könnten die beiden der bereits diskutierten Thesen über den Ursprung der EpCAM-positiven Zellen verantwortlich sein, und diese sollen an dieser Stelle noch einmal kurz zusammengefasst werden (Abb. 27):

Thesen: EpCAM auf...	GvHD	akute	chronische	
			keine/ limitierte	extensive
1. Epithelzelle		<ul style="list-style-type: none"> - Zytokinsturm - Th-1-Zellantwort - akut, inflammatorische Reaktion → Apoptose 	<ul style="list-style-type: none"> - Th-2-Zellantwort - chronisch, fibrotische Umbauten 	
			<ul style="list-style-type: none"> - Gewebe-regeneration ↑ - Migration durch EMT möglich 	<ul style="list-style-type: none"> - immunologische Zerstörung EpCAM-positiver Zellen ↑ - keine Migration
2. Hämatopoetische Zelle		- zeitgleiches Auftreten EpCAM-positiver Zellen und Hämatopoetischer Rekonstitution		
		- gestörte Thymopoese	<ul style="list-style-type: none"> - Thymusschaden ↓ - Immunsuppression ↓ - GvHD-hemmende EpCAM-positive DC-Subpopulation 	<ul style="list-style-type: none"> - Thymusschaden ↑ - Immunsuppression ↑
			<ul style="list-style-type: none"> ↪ zirkulierende EpCAM-positive Zellen ↑ 	<ul style="list-style-type: none"> ↪ zirkulierende EpCAM-positive Zellen ↓

Abb. 27: Gegenüberstellung der beiden Hypothesen über den Ursprung EpCAM-positiver Zellen unter Berücksichtigung des GvHD (Graft-versus-Host Disease) -Status.

EMT= Epitheliale- Mesenchymale- Transition; DC= dendritische Zellen, Th= T-Helferzellen

Dabei ist zu ergänzen, dass die Zellzahlenanstiege des Beispielpatienten auch auf die Osteosyntheseoperationen und die Sepsis als generalisierte Entzündung zurückführbar sein könnten. Des Weiteren traten schon vor allogener HSCT EpCAM-positive Zellen im engen zeitlichen Zusammenhang mit einer Nagelbettentzündung auf. Dieser Sachverhalt ließe sich am ehesten mit der These „EpCAM als Antigen auf Epithelzellen“, welche durch Gewebeschädigung oder/und -regeneration in die Blutzirkulation gelangten, vereinbaren.

6.5.2 Verläufe bei der AML

Bei den acht allogenen transplantierten Patienten, die an einer AML erkrankt waren, konnte man ähnliche Sachverhalte wie bei den vier Patienten mit ALL beobachten.

Die fünf Patienten mit einem Verlauf von weniger als einem Jahr zeigten, dass auch während der akut toxischen Phase nach allogener HSCT EpCAM-positive Zellen nachweisbar waren. Alle zeigten Spitzenwerte der EpCAM-positiven Zellen/ml zwischen dem zweiten und achten Monat nach allogener HSCT ohne später eine chronische GvHD zu entwickeln. Kurz vor diesen Spitzenwerten wurde bei vier Patienten ein AML-Rezidiv klinisch diagnostiziert (siehe Abb. 18). Daraufhin wurde die Immunsuppression komplett oder partiell abgesetzt, was

teilweise eine Reaktivierung der akuten GvHD auslöste. Möglicherweise stiegen die Zellen durch die fehlende Immunsuppression an, dies würde zur These der immunsuppressiven Modulation „EpCAM-positiver Lymphozyten“ passen. Der Zellzahl-anstieg dieses Patienten war sehr hoch. Die zeitgleiche DLI könnte zu diesem Anstieg EpCAM-positiver Zellen beigetragen haben. Lymphozyten könnten entweder als Empfängerantwort auf die DLI EpCAM exprimieren, oder EpCAM-positive Zellen gelangen vom Spender aus über die DLI in die Blutzirkulation des Patienten. Interessanterweise zeigte Patient FS EpCAM-positive Zellen schon vor allogener HSCT im Zusammenhang mit einer Operation (Sanierung einer Thorakotomienarbe wegen Wundheilungsstörung) in der Blutzirkulation. Das heißt, unter bestimmten Umständen wie z.B. Entzündungen oder Operationen können, unabhängig von einer HSCT und GvHD, EpCAM-positive Zellen in der Blutbahn nachgewiesen werden. Dies wiederum spricht gegen die Hypothese, dass es sich bei den EpCAM positiven Zellen um Lymphozyten handelt. Durch Schäden an EpCAM-positiven Geweben und durch Überexpression von EpCAM als Zeichen der Geweberegeneration könnten diese Zellen in die Blutbahn gelangen. Die letale CMV-Kolitis bei Patient SB schien den Zellverlauf, wie schon bei den Patienten der ALL-Gruppe vermutet, nicht zu beeinflussen.

6.5.3 Verläufe beim Myelom

Die Zellzahldynamik der vier Patienten mit multiplem Myelom zeigte nach Anstieg der EpCAM-positiven Zellen/ml ein relativ hohes Plateau. Im Kontext der limitierten chronischen GvHD aller vier Patienten könnte der damit verbundene, höhere EpCAM-positive Zellzahl-nachweis für beide Thesen über den Ursprung der Zellen sprechen. Auch bei diesen Patienten hatte die CMV-Infektionen keinen Einfluss auf EpCAM-positive Zellen im Blut. Die Diagnosestellungen der Myelom-Rezidive erfolgten erst nach dem Anstieg der EpCAM-positiven Zellen. Nach Absetzen der immunsuppressiven Therapie sind die EpCAM-positiven Zellen im Gegensatz zu den Verläufen bei der ALL-Gruppe nicht bzw. nur minimal gestiegen. Die Anstiege können also nicht allein auf das Absetzen der Immunsuppressiva zurückgeführt werden. In diesem Kontext erscheint eine Studie von Bersagel et al. besonders interessant, in deren Rahmen EpCAM auf einigen humanen Myelom-Zelllinien nachweisbar war (Bersagel et al. 1992). Es stellt sich die Frage, ob der Zellzahl-anstieg und das hohe Zellniveau eventuell auf „EpCAM-positive Myelomzellen“ beruht. Diese Zellen, welche noch vor der klinischen Diagnose des Rezidivs in der Blutzirkulation nachweisbar waren müssten allerdings CD138 negativ sein. Zudem schien es, als ob mit fortschreitender Therapie des Myelomes ein Sinken der EpCAM-positiven Zellen, bzw. durch Pausen dieser Therapie, ein Ansteigen der Zellen zu verzeichnen war. Allerdings verlief der Anstieg der CD138-positiven Zellen ganz anders. Eine Korrelation mit den EpCAM-positiven Zellen war daher nicht zu erkennen (siehe Abb. 19).

Umgekehrt waren bei Patient KS bei Myelom-Rezidiv ohne GvHD, keine EpCAM-positiven Zellen nachweisbar. Wenn es sich bei den EpCAM-positiven Zellen um Myelom Zellen handeln würde, würde man eher viele EpCAM-positive Zellen erwarten. Es müsste sich dann um EpCAM-negative Myelomzellen handeln (Bergsagel et al. 1992).

6.5.4 Verläufe bei der CML

Bei den 19 Patienten der CML-Gruppe waren in der Phase der akuten GvHD keine bzw. nur wenige EpCAM-positive Zellen/ml nachweisbar. Nach dem Anstieg der EpCAM-positiven Zellzahl fielen die EpCAM-positiven Zellen mit steigender Intensität der chronischen GvHD ab. Patient GI (siehe Abb. 25) macht diesen Sachverhalt am deutlichsten. Mit Verschlechterung der chronischen GvHD und Zunahme der medikamentösen Immunsuppression fielen die EpCAM-positiven Zellen/ml Blut. Ähnliche Beobachtungen konnten bei den Patienten KE und MH (siehe Abb. 23 und Abb. 24) gemacht werden.

Bei Patienten mit temporär sehr hohen EpCAM-positiven Zellen/ml Blut trotz extensiver chronischer GvHD (z.B. siehe Abb. 21) scheinen andere Faktoren zu einem Ausschwemmen EpCAM-positiver Zellen in die Blutzirkulation geführt zu haben, dies könnten Operationen oder Entzündungen gewesen sein. So stiegen bei den Patienten, welche sich einem operativen Eingriff unterzogen (siehe Abb. 21, Abb. 22 und Abb. 24), die EpCAM-positiven Zellen/ml Blut bis drei Monate nach dem Eingriff regelmäßig an. Entzündungen wie schwere Nagelbettentzündungen, offenen Erosionen an den Extremitäten, Sigmoiditis und Lymphadenitis waren ebenfalls mit einem Zellanstieg assoziiert. Iatrogene oder entzündliche Schädigungen an EpCAM-positiven Geweben könnten zur Freisetzung EpCAM-positiver Zellen in die Blutbahn führen (K. Pachmann, unpubliziert).

Interessanterweise waren bei Patient LG trotz Glottiskarzinom und Operation keine EpCAM-positiven Zellen im Blut nachweisbar. Das Plattenepithel der Glottis zeigt in allen dysplastischen Regionen eine EpCAM-Expression (Winter et al. 2003a). Des Weiteren deutet ein Nachweis von EpCAM-positiven Zellen in Knochenmark und Blut bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches auf disseminierte Tumorzellen (Chaubal et al. 1999). Unklar bleibt, weshalb keine EpCAM-positiven Zellen trotz Operation im Blut nachweisbar waren.

7 SCHLUSSFOLGERUNG

Wir konnten in der vorgelegten Arbeit zeigen, dass zirkulierende EpCAM-positive Zellen regelmäßig bei Patienten nach allogener HSCT in der Blutzirkulation auftreten. Da Patienten nach allogener HSCT eher selten epitheliale Tumore entwickeln, können diese Zellen daher kaum zirkulierende Tumorzellen sein. Epitheliale Zellen können also offensichtlich auch bei Nicht-Karzinompatienten unter bestimmten Bedingungen im Blut zirkulieren. Im Allgemeinen konnten zirkulierende EpCAM-positive Zellen nach etwa drei Monaten im Blut nachgewiesen werden. Nach 12 Monaten erreichten diese ein Plateau bei etwa 1.000 Zellen/ml Blut. Diese Zellzahldynamik bestand unabhängig von der Erkrankung, die ursächlich für die allogene HSCT war.

Durch Korrelation des klinischen Verlaufes mit dem Verlauf der EpCAM-positiven Zellen, konnten Rückschlüsse auf mögliche Ursachen der EpCAM-positiven Zellausschwemmung gezogen werden. Die genauere Analyse zeigte keinen Zusammenhang der EpCAM-positiven Zellen mit der akuten GvHD, wohl aber mit der chronischen GvHD. Die Zahl der EpCAM-positiven Zellen korrelierten dabei umkehrt mit der Stärke der chronischen GvHD.

Es wurden zwei mögliche Hypothesen, um welche Zellen es sich bei den Zellen, die EpCAM auf ihrer Oberfläche tragen handeln könnte, diskutiert: „EpCAM auf Epithelzellen“ und „EpCAM auf hämatopoetischen Zellen“. Keine der Hypothesen konnte aus den Daten bewiesen werden. Möglich wäre auch das parallele Auftreten „EpCAM-positiver Epithelzellen und hämatopoetischen Zellen“ aus verschiedensten Ursachen.

EpCAM-positive Zellen wurden auch nach Operationen oder bei Entzündungen nachgewiesen. Diese schienen unabhängig von der allogenen HSCT den Zellzahlverlauf der EpCAM-positiven Zellen zu beeinflussen. Weitere Untersuchungen über die Bedeutung und das Verhalten von EpCAM-positiven Zellen im zirkulierenden Blut bei der Graft-versus-Host Reaktion sind anzustreben.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- Anderson R, Schaible K, Heasman J, Wylie C. 1999. **Expression of the homophilic adhesion molecule, Ep-CAM, in the mammalian germ line.** J Reprod Fertil, 116:379-384.
- Antin JH, Ferrara JL. 1992. **Cytokine dysregulation and acute graft-versus-host disease.** Blood., 80(12):2964-8.
- Baird K, Pavletic SZ. 2006. **Chronic graft versus host disease.** Curr Opin Hematol., 13(6):426-35.
- Balzar M, Bakker HA, Briaire-de-Bruijn IH, Fleuren GJ, Warnaar SO, Litvinov SV. 1998. **Cytoplasmic tail regulates the intercellular adhesion function of the epithelial cell adhesion molecule.** Mol Cell Biol., 18(8):4833-43.
- Baruerle PA, Gires O. 2007. **EpCAM (CD326) finding its role in cancer.** Br J Cancer, 96(3):417-423.
- Bergsagel PL, Victor-Kobrin C, Timblin CR, Trepel J, Kuehl WM. 1992. **A murine cDNA encodes a pan-epithelial glycoprotein that is also expressed on plasma cells.** J Immunol., 148(2):590-6.
- Billingham Re. 1966. **The Biology of Graft-versus-Host Reaction.** Harvery Lectures, 62:21-78.
- Borkowski TA, Nelson AJ, Farr AG, Udey MC. 1996. **Expression of gp40, the murine homologue of human epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM), by murine dendritic cells.** Eur J Immunol.;26(1):110-4.
- Breuhahn K, Baeuerle PA, Peters M, Prang N, Töx U, Köhne-Volland R, Dries V, Schirmacher P, Leo E. 2006. **Expression of epithelial cellular adhesion molecule (Ep-CAM) in chronic (necro-)inflammatory liver diseases and hepatocellular carcinoma.** Hepatol Res., 34(1):50-6.
- Byth KF, Conroy LA, Howlett S, Smith AJ, May J, Alexander DR, Holmes N. 1996. **CD45-null transgenic mice reveal a positive regulatory role for CD45 in early thymocyte development, in the selection of CD4+CD8+ thymocytes, and B cell maturation.** J Exp Med.;183(4):1707-18
- Chao NJ, Schmidt GM, Niland JC, Amylon MD, Dagis AC, Long GD, Nademanee AP, Negrin RS, O'Donnell MR, Parker PM, et al. 1993. **Cyclosporine, methotrexate, and prednisone compared with cyclosporine and prednisone for prophylaxis of acute graft-versus-host disease.** N Engl J Med., 329(17):1225-30.
- Chaubal S, Wollenberg B, Kastenbauer E, Zeidler R. 1999. **Ep-CAM-a marker for the detection of disseminated tumor cells in patients suffering from SCCHN.** Anticancer Res, 19(3B): 2237-42.
- Cirulli V, Crisa L, Beattie GM, Mally MI, Lopez AD, Fannon A, Ptaszniak A, Inverardi L, Ricordi C, Deerinck T, Ellisman M, Reisfeld RA, Hayek A. 1998. **KSA antigen Ep-CAM mediates cell-cell adhesion of pancreatic epithelial cells: morphoregulatory roles in pancreatic islet development.** J Cell Biol, 140(6):1519-34.

- Couriel D, Saliba R, Hicks K, Ippoliti C, de Lima M, Hosing C, Khouri I, Andersson B, Gajewski J, Donato M, Anderlini P, Kontoyiannis DP, Cohen A, Martin T, Giralt S, Champlin R. 2004. **Tumor necrosis factor-alpha blockade for the treatment of acute GVHD.** Blood.;104(3):649-54.
- Daniel V. 2008. **Dendritische Zellen und Immunsuppression nach Organtransplantation.** LaboratoriumsMedizin 2008 32:3 , 131-139
- de Boer CJ, van Krieken JH, Janssen-van Rhijn CM, Litvinov SV. 1999. **Expression of Ep-CAM in normal, regenerating, metaplastic, and neoplastic liver.** J Pathol; 188:201-206.
- Einsele H, Kanz L. 1999. **Allogene Stammzelltransplantation.** Der Internist; 40:1249-1256
- Epler GR. 1988. **Bronchiolitis obliterans and airways obstruction associated with graft-versus-host disease.** Clin Chest Med.;9(4):551-6.
- Farag SS, Fehniger TA, Ruggeri L, Velardi A, Caligiuri MA. 2002. **Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect.** Blood.;100(6):1935-47.
- Fehm T, Hoffmann O, Aktas B, Becker S, Solomayer EF, Wallwiener D, Kimmig R, Kasimir-Bauer S. 2009. **Detection and characterization of circulating tumor cells in blood of primary breast cancer patients by RT-PCR and comparison to status of bone marrow disseminated cells.** Breast Cancer Res.;11(4):R59.
- Ferrara JL, Reddy P. 2006. **Pathophysiology of graft-versus-host disease.** Semin Hematol, 43:3-10.
- Ferrara JL, Deeg HJ. 1991. **Graft-versus-Host disease.** N Engl J Med., 324(10):667-674.
- Flieger D, Hoff AS, Sauerbruch T, Schmidt-Wolf IG. 2001. **Influence of cytokines, monoclonal antibodies and chemotherapeutic drugs on epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) and LewisY antigen expression.** Clin Exp Immunol.;123(1):9-14.
- Fong D, Steurer M, Obrist P, Barbieri V, Margreiter R, Amberger A, Laimer K, Gastl G, Tzankov A, Spizzo G. 2008. **Ep-CAM expression in pancreatic and ampullary carcinomas: frequency and prognostic relevance.** J Clin Pathol., 61(1):31-5.
- Fouquet S, Lugo-Martínez VH, Faussat AM, Renaud F, Cardot P, Chambaz J, Pinçon-Raymond M, Thenet S. 2004. **Early loss of E-cadherin from cell-cell contacts is involved in the onset of Anoikis in enterocytes.** J Biol Chem.;279(41):43061-9.
- Franklin RM, Kenyon KR, Tutschka PJ, Saral R, Green WR, Santos GW. 1983. **Ocular manifestations of graft-vs-host disease.** Ophthalmology., 90(1):4-13.
- Gargett CE, Schwab KE, Zillwood RM, Nguyen HP, Wu D. 2009. **Isolation and culture of epithelial progenitors and mesenchymal stem cells from human endometrium.** Biol Reprod.;80(6):1136-45.
- Giralt S, Hester J, Huh Y, Hirsch-Ginsberg C, Rondón G, Seong D, Lee M, Gajewski J, Van Besien K, Khouri I, Mehra R, Przepiorka D, Körbling M, Talpaz M, Kantarjian H, Fischer H, Deisseroth A, Champlin R. 1995. **CD8-depleted donor lymphocyte infusion as treatment for relapsed chronic myelogenous leukemia after allogeneic bone marrow transplantation.** Blood.;86(11):4337-43.

- Gires O, Kieu C, Fix P, Schmitt B, Münz M, Wollenberg B, Zeidler R. 2001. **Tumor necrosis factor alpha negatively regulates the expression of the carcinoma-associated antigen epithelial cell adhesion molecule.** Cancer.;92(3):620-8.
- Glucksberg H, Storb R, Fefer A, Buckner CD, Neiman PE, Clift RA, Lerner KG, Thomas ED. 1974. **Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors.** Transplantation.;18(4):295-304.
- Goulmy E, Schipper R, Pool J, Blokland E, Falkenburg JH, Vossen J, Gratwohl A, Vogelsang GB, van Houwelingen HC, van Rood JJ. 1996. **Mismatches of minor histocompatibility antigens between HLA-identical donors and recipients and the development of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation.** N Engl J Med.;334(5):281-5.
- Guarino M, Tosoni A, Nebuloni M. 2009. **Direct contribution of epithelium to organ fibrosis: epithelial-mesenchymal transition.** Hum Pathol.;40(10):1365-76.
- Herlyn M., Steplewski Z., Herlyn D. and Koprowski, H. (1979) **Colorectal carcinomaspecific antigen: detection by means of monoclonal antibodies.** Proc Natl Acad Sci USA, 76:1438-1442.
- Hermiston ML, Xu Z, Weiss A. 2003. **CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells.** Annu Rev Immunol.;21:107-37.
- Hess AD, Jones RJ, Morris LE, Noga SJ, Vogelsang GB, Santos GW. 1992 **Autologous graft-versus-host disease: a novel approach for antitumor immunotherapy.** Hum Immunol., 34(3):219-24.
- High AS, Robinson PA, Klein CE. 1996. **Increased expression of a 38kd cell-surface glycoprotein MH99 (KS 1/4) in oral mucosal dysplasias.** J Oral Pathol Med, 25(1): 10-3.
- Ho VT, Soiffer RJ. 2001. **The history and future of T-cell depletion as graft-versus-host disease prophylaxis for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.** Blood.; 98(12):3192-204.
- Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, Goldman JM, Kersey J, Kolb HJ, Rimm AA, Ringdén O, Rozman C, Speck B, et al. 1990. **Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation.** Blood.;75(3):555-62
- Hurley CK, Wade JA, Oudshoorn M, Middleton D, Kukuruga D, Navarrete C, Christiansen F, Hegland J, Ren EC, Andersen I, Cleaver SA, Brautbar C, Raffoux C. 1999. **A special report: histocompatibility testing guidelines for hematopoietic stem cell transplantation using volunteer donors. Quality Assurance and Donor Registries Working Groups of the World Marrow Donor Association.** Hum Immunol.;60(4):347-60.
- Jakobson DA, Vogelsang GB. 2007. **Acute graft versus host disease.** Orphanet J Rare Dis.;2:35.
- Jozefczuk J, Chavez L, Stachelscheid H, Herwig R, Lehrach H, Zeilinger K, Gerlach JC, Adjaye J. 2009. **Molecular characterization of cultured adult human liver progenitor cells.** Tissue Eng Part C Methods.; [Epub ahead of print]
- Johnson ML, Farmer ER. 1998. **Graft-versus-Host reaction in dermatology.** J Am Acad dermatol 38(3):369-397.

- Kalluri R, Neilson EG. 2003. **Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis.** J Clin Invest.;112(12):1776-84.
- Karrer S. 2003. **Graft-versus-Host Disease der Haut.** Der Hautarzt 54:465-482
- Kasper M, Behrens J, Schuh D, Müller D. 1995. **Distribution of E-cadherin and Ep-CAM in the human lung during development and after injury.** Histochem Cell Biol, 103(4):281-6.
- Klein CE, Cordon-Cardo C, Soehnchen R, Cote RJ, Oettinger HF, Eisinger M, OLD LJ. 1987. **Changes in Cell surface glycoprotein expression during differentiation of human Keratinocytes.** J Invest Dermatol, 89:500-506 (1)a **EpCAM induces ductal morphogenesis and hyperplasia in mammary glands.** 128-147
- Koc S, Leisenring W, Flowers ME, Anasetti C, Deeg HJ, Nash RA, Sanders JE, Witherspoon RP, Appelbaum FR, Storb R, Martin PJ. 2000. **Thalidomide for treatment of patients with chronic graft-versus-host disease.** Blood.;96(12):3995-6.
- Kolb HJ. 2008. **Graft-versus-leukemia effects of transplantation and donor lymphocytes.** Blood.;112(12):4371-83.
- Kolb HJ, Mittermüller J, Clemm C, Holler E, Ledderose G, Brehm G, Heim M, Wilmanns W. 1990. **Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients.** Blood.;76(12):2462-5.
- Koprowski H, Steplewski Z, Mitchell K, Herlyn M, Herlyn D, Fuhrer P. 1979. **Colorectal carcinoma antigens detected by hybridoma antibodies.** Somatic Cell Genet, 5:957–971.
- Krenger W, Holländer GA. 2008. **The thymus in GVHD pathophysiology.** Best Pract Res Clin Haematol.;21(2):119-28.
- Kröger N, Zander AR. 2004. **Allogene Stammzelltherapie-Grundlagen, Indikation und Perspektiven.** Erste Aufl. Bremen:UNI-MED (4s)
- Kung C, Pingel JT, Heikinheimo M, Klemola T, Varkila K, Yoo LI, Vuopala K, Poyhonen M, Uhari M, Rogers M, Speck SH, Chatila T, Thomas ML. 2000. **Mutations in the tyrosine phosphatase CD45 gene in a child with severe combined immunodeficiency disease.** Nat Med.;6(3):343-5.
- Ladwein M, Pape UF, Schmidt DS, Schnölzer M, Fiedler S, Langbein L, Franke WW, Moldenhauer G, Zöller M. 2005. **The cell-cell adhesion molecule EpCAM interacts directly with the tight junction protein claudin-7.** Exp Cell Res.;309(2):345-57.
- Lammers R, Giesert C, Grünebach F, Marxer A, Vogel W, Bühring HJ. 2002. **Monoclonal antibody 9C4 recognizes epithelial cellular adhesion molecule, a cell surface antigen expressed in early steps of erythropoiesis.** Exp Hematol.;30(6):537-45.
- Lange S, Bender R. 2007. **Median oder Mittelwert?** Dtsch Med Wochenschr. ;132:e1-e2.
- Lee SJ. 2005. **New approaches for preventing and treating chronic graft-versus-host disease.** Blood , 105:4200-6.
- Lee SJ, Vogelsang G, Flowers ME. 2003. **Chronic graft-versus-host disease.** Biol Blood Marrow Transplant., 9(4):215-33.

- Le Naour F, André M, Greco C, Billard M, Sordat B, Emile JF, Lanza F, Boucheix C, Rubinstein E. 2006. **Profiling of the tetraspanin web of human colon cancer cells.** Mol Cell Proteomics.;5(5):845-57.
- Litvinov SV, Balzar M, Winter MJ, Bakker HA, Briaire-de Bruijn IH, Prins F, Fleuren GJ, Warnaar SO. 1997. **Epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) modulates cell-cell interactions mediated by classic cadherins.** J Cell Biol.,139(5):1337-48.
- Litvinov SV, van Driel W, van Rhijn CM, Bakker HA, van Krieken H, Fleuren GJ, Warnaar SO. 1996. **Expression of Ep-CAM in cervical squamous epithelia correlates with an increased proliferation and the disappearance of markers for terminal differentiation.** Am J Pathol 148(3):865-75.
- Litvinov SV, Velders MP, Bakker HA, Fleuren GJ, Warnaar SO. 1994. **EpCAM: a human epithelial antigen is a homophilic cell-cell adhesion molecule.** J Cell Biol, 125:437-446.
- Luft T, Conzelmann M, Benner A, Rieger M, Hess M, Strohhaecker U, Görner M, Hegenbart U, Ho AD, Dreger P. 2007. **Serum cytokeratin-18 fragments as quantitative markers of epithelial apoptosis in liver and intestinal graft-versus-host disease.** Blood.;110(13):4535-42.
- Lum LG. 1987. **The kinetics of immune reconstitution after human marrow transplantation.** Blood.;69(2):369-80.
- Mackall CL, Granger L, Sheard MA, Cepeda R, Gress RE. 1993. **T-cell regeneration after bone marrow transplantation: differential CD45 isoform expression on thymic-derived versus thymic-independent progeny.** Blood.;82(8):2585-94.
- Maetzel D, Denzel S, Mack B, Canis M, Went P, Benk M, Kieu C, Papior P, Baeuerle PA, Munz M, Gires O. 2009. **Nuclear signalling by tumour-associated antigen EpCAM.** Nat Cell Biol. (2):162-71.
- Maury S, Mary JY, Rabian C, Schwarzingen M, Toubert A, Scieux C, Carmagnat M, Esperou H, Ribaud P, Devergie A, Guardiola P, Vexiau P, Charron D, Gluckman E, Socié G. 2001. **Prolonged immune deficiency following allogeneic stem cell transplantation: risk factors and complications in adult patients.** Br J Haematol., 115(3):630-41.
- Mitsuyasu RT, Champlin RE, Gale RP, Ho WG, Lenarsky C, Winston D, Selch M, Elashoff R, Giorgi JV, Wells J, et al. 1986. **Treatment of donor bone marrow with monoclonal anti-T-cell antibody and complement for the prevention of graft-versus-host disease. A prospective, randomized, double-blind trial.** Ann Intern Med.,105(1):20-6.
- Moldenhauer G, Momburg F, Moller P, Schwartz R, Hammerling GJ. 1987. **Epithelium-specific surface glycoprotein of Mr 34,000 is a widely distributed humancarcinoma marker.** Br J Cancer, 56:714-721.
- Münz M, Kieu C, Mack B, Schmitt B, Zeidler R, Gires O. 2004. **The carcinoma-associated antigen EpCAM upregulates c-myc and induces cell proliferation.** Oncogene.,23(34):5748-58.
- Nagao K, Ginhoux F, Leitner WW, Motegi S, Bennett CL, Clausen BE, Merad M, Udey MC. 2009. **Murine epidermal Langerhans cells and langerin-expressing dermal**

- dendritic cells are unrelated and exhibit distinct functions.** Proc Natl Acad Sci U S A. ;106(9):3312-7.
- Nelson AJ, Dunn RJ, Peach R, Aruffo A, Farr AG. 1996. **The murine homolog of human Ep-CAM, a homotypic adhesion molecule, is expressed by thymocytes and thymic epithelial cells.** Eur J Immunol., 26(2):401-8.
- Nochi T, Yuki Y, Terahara K, Hino A, Kunisawa J, Kweon MN, Yamaguchi T, Kiyono H. 2004. **Biological role of Ep-CAM in the physical interaction between epithelial cells and lymphocytes in intestinal epithelium.** Clin Immunol., 113(3):326-39.
- Ogawa Y, Shimmura S, Kawakita T, Yoshida S, Kawakami Y, Tsubota K. 2009. **Epithelial Mesenchymal Transition in Human Ocular Chronic Graft-Versus-Host Disease.** Am J Pathol. [Epub ahead of print]
- Orti-Raduan ES, Nunes AJ, Oliveira DT, Lara VS, Taveira LA. 2009. **Quantitative analysis of Langerhans' cells in oral chronic graft-vs.-host disease.** J Oral Pathol Med.;38(1):132-7.
- Osta WA, Chen Y, Mikhitarian K, Mitas M, Salem M, Hannun YA, Cole DJ, Gillanders WE. 2006. **EpCAM is overexpressed in breast cancer and is a potential target for breast cancer gene therapy.** Cancer Res., 64(16):5818-24. (1)
- Pachmann K, Clement JH, Schneider CP, Willen B, Camara O, Pachmann U, Höffken K. 2005. **Standardized quantifikation of circulating peripheral tumor cells from lung and breast cancer.** Clin Chem Lab Med, 43(6):617-627.
- Pachmann K, Heiß P, Demel U, Tilz G. 2001. **Detection and Quantifikation of small numbers of Circulating Tumour Cells in peripheral blood using Laser scanning Cytometer.** Clin Chem Lab Med, 39(9):811-817.
- Pantel K, Felber E, Schlimok G. 1994. **Detection and characterization of residual disease in breast cancer.** J Hematother., 3(4):315-22.
- Patriarca F, Skert C, Sperotto A, Zaja F, Falletti E, Mestroni R, Kikic F, Calistri E, Fili C, Geromin A, Cerno M, Fanin R. 2006. **The development of autoantibodies after allogeneic stem cell transplantation is related with chronic graft-vs-host disease and immune recovery.** Exp Hematol., 34(3):389-96.
- Pavletic ZS, Joshi SS, Pirruccello SJ, Tarantolo SR, Kollath J, Reed EC, Bierman PJ, Vose JM, Warkentin PI, Gross TG, Nasrati K, Armitage JO, Kessinger A, Bishop MR. 1998. **Lymphocyte reconstitution after allogeneic blood stem cell transplantation for hematologic malignancies.** Bone Marrow Transplant.;21(1):33-41.
- Piyathilake CJ, Frost AR, Weiss H, Manne U, Heimbürger DC, Grizzle WE. 2000. **The expression of Ep-CAM (17-1A) in squamous cell cancers of the lung.** Hum Pathol., 31(4):482-7.
- Poczatek RB, Myers RB, Manne U, Oelschlager DK, Weiss HL, Bostwick DG, Grizzle WE. 1999. **Ep-Cam levels in prostatic adenocarcinoma and prostatic intraepithelial neoplasia.** J Urol., 162(4):1462-6.
- Podsypanina K, Du YC, Jechlinger M, Beverly LJ, Hambardzumyan D, Varmus H. 2008. **Seeding and propagation of untransformed mouse mammary cells in the lung.** Science.;321(5897):1841-4.

- Proca DM, Niemann TH, Porcell AI, DeYoung BR. 2000. **MOC31 immunoreactivity in primary and metastatic carcinoma of the liver. Report of findings and review of other utilized markers.** Appl Immunohistochem Mol Morphol.,8(2):120-5.
- Przepiorka D, Weisdorf D, Martin P, Klingemann HG, Beatty P, Homs J, Thomas ED. 1995. **1994 Consensus Conference on Acute GvHD Grading.** Bone Marrow Transplantation, 15(6): 825-828.
- Rao CG, Chianese D, Doyle GV, Miller MC, Russell T, Sanders RA Jr, Terstappen LW. 2005. **Expression of epithelial cell adhesion molecule in carcinoma cells present in blood and primary and metastatic tumors.** Int J Oncol., 27(1):49-57. (1)
- Ratanatharathorn V, Ayash L, Lazarus HM, Fu J, Uberti JP. 2001. **Chronic graft-versus-host disease: clinical manifestation and therapy.** Bone Marrow Transplant., 28(2):121-9.
- Redding SW, Callander NS, Haveman CW, Leonard DL. 1998. **Treatment of oral chronic graft-versus-host disease with PUVA therapy: case report and literature review.** Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod., 86(2):183-7.
- Reddy P, Ferrara JL. 2003. **Immunobiology of acute Graft-versus-host Disease.** Blood Rev, 17: 187-94.
- Rezvani K, Mielke S, Ahmadzadeh M, Kilical Y, Savani BN, Zeilah J, Keyvanfar K, Montero A, Hensel N, Kurlander R, Barrett AJ. 2006. **High donor FOXP3-positive regulatory T-cell (Treg) content is associated with a low risk of GVHD following HLA-matched allogeneic SCT.** Blood.,108(4):1291-7.
- Riethmüller G, Schlimok G, Kufer P, Gruber R, Holz E, Pantel K. 1996. **Minimal Residual Disease in solide cancer: the diagnostic and therapeutic opportunity for monoclonal antibodies.** Ann Oncol, 7:Suppl 1:17.
- Ruutu T, Hermans J, van Biezen A, Niederwieser D, Gratwohl A, Apperley JF. 1998. **How should corticosteroids be used in the treatment of acute GVHD? EBMT Chronic Leukemia Working Party. European Group for Blood and Marrow Transplantation.** Bone Marrow Transplant. ,22(6):614-5.
- Sale GE, Alavaikko M, Scharfers KM, Mahn CT. 1992. **Abnormal CD4/CD8 ration and delayed germinal center reconstruction in lymph nodes of human graft recipients with GvHD.** Exp Hematol, 20(8):1017-1021.
- Salem RR, Wolf BC, Sears HF, Lavin PT, Ravikumar TS, DeCoste D, D'Emilia JC, Herlyn M, Schlom J, Gottlieb LS. 1993 **Expression of colorectal carcinoma-associated antigens in colonic polyps.** J Surg Res.,55(3):249-55.
- Sarantopoulos S, Stevenson KE, Kim HT, Bhuiya NS, Cutler CS, Soiffer RJ, Antin JH, Ritz J. 2007. **High levels of B-cell activating factor in patients with active chronic graft-versus-host disease.** Clin Cancer Res. ;13(20):6107-14.
- Scarisbrick JJ, Taylor P, Holtick U, Makar Y, Douglas K, Berlin G, Juvonen E, Marshall S; Photopheresis Expert Group. 2008. **U.K. consensus statement on the use of extracorporeaphotopheresis for treatment of cutaneous T-cell lymphoma and chronic graft-versus-host disease.** Br J Dermatol.,158(4):659-78.
- Schiechl H, Dohr G, Eherer A. 1986. **Immunohistochemical localization and characterization of a protein from the basolateral membrane of rat small intestine**

- epithelium using monoclonal antibody GZ-1.** J Histochem Cytochem 34(12): 1659-65.
- Schmidt DS, Klingbeil P, Schnölzer M, Zöller M. 2004. **CD44 variant isoforms associate with tetraspanins and EpCAM.** Exp Cell Res.,297(2):329-47.
- Sherer Y, Shoenfeld Y. 1998. **Autoimmune diseases and autoimmunity post-bone marrow transplantation.** Bone Marrow Transplant., 22(9):873-81.
- Shiah SG, Chang LC, Tai KY, Lee GH, Wu CW, Shieh YS. 2009. **The involvement of promoter methylation and DNA methyltransferase-1 in the regulation of EpCAM expression in oral squamous cell carcinoma.** Oral Oncol. (1):e1-8.
- Shulman HM, Sullivan KM, Weiden PL, McDonald GB, Striker GE, Sale GE, Hackman R, Tsoi MS, Storb R, Thomas ED. 1980. **Chronic graft-versus-host syndrome in man. A long-term clinicopathologic study of 20 Seattle patients.** Am J Med., 69(2):204-17.
- Sosa R, Weiden PL, Storb R, Syrotuck J, Thomas ED. 1980. **Granulocyte function in human allogeneic marrow graft recipients.** Exp Hematol.;8(10):1183-9.
- Spizzo G, Went P, Dirnhofer S, Obrist P, Simon R, Spichtin H, Maurer R, Metzger U, von Castelberg B, Bart R, Stopatschinskaya S, Köchli OR, Haas P, Mross F, Zuber M, Dietrich H, Bischoff S, Mirlacher M, Sauter G, Gastl G. 2004. **High Ep-CAM expression is associated with poor prognosis in node-positive breast cancer.** Breast Cancer Res Treat., 86(3):207-13.
- Sun Y, Tawara I, Toubai T, Reddy P. 2007. **Pathophysiology of acute graft-versus-host disease: recent advances.** Transl Res., 150(4):197-214.
- Storb R, Deeg HJ, Whitehead J, Appelbaum F, Beatty P, Bensinger W, Buckner CD, Clift R, Doney K, Farewell V, et al. 1986. **Methotrexate and cyclosporine compared with cyclosporine alone for prophylaxis of acute graft versus host disease after marrow transplantation for leukemia.** N Engl J Med.,314(12):729-35.
- Stoecklein NH, Siegmund A, Scheunemann P, Luebke AM, Erbersdobler A, Verde PE, Eisenberger CF, Peiper M, Rehders A, Esch JS, Knoefel WT, Hosch SB. 2006. **Ep-CAM expression in squamous cell carcinoma of the esophagus: a potential therapeutic target and prognostic marker.** BMC Cancer.,6:165.
- Stingl J, Eaves CJ, Zandieh I, Emerman JT.2001. **Characterization of bipotent mammary epithelial progenitor cells in normal adult human breast tissue.** Breast Cancer Res Treat, 67(2):93–109
- Strasser SI, McDonald GB. 1999. **Gastrointestinal and hepatic complications.** In Thomas ED, Blume KB, Forman SJ: **Hematopoietic cell transplantation** (2nd Edition), Oxford: Blackwell Scientific Publikation.
- Sullivan KM, Shulman HM, Storb R, Weiden PL, Witherspoon RP, McDonald GB, Schubert MM, Atkinson K, Thomas ED. 1981. **Chronic graft-versus-host disease in 52 patients: adverse natural course and successful treatment with combination immunosuppression.** Blood., 57(2):267-76.
- Sun Y, Tawara I, Toubai T, Reddy P. 2007. **Pathophysiologie of Acute Graft-versus-Host Disease: recent Advances.** Transl Res, 150(4):197-214.

- Tabbara IA, Zimmermann K, Morgan C, Nahleh Z. 2002. **Allogenic Hematopoietic Stem Cell Transplantation**. Arch Intern Med., 162(14):1558-66.
- Taguchi N, Hashimoto Y, Naiki M, Farr AG, Boyd RL, Ansari AA, Shultz LD, Kotzin BL, Dorshkind K, Ikehara S, Gershwin ME. 1999. **Abnormal thymic expression of epithelial cell adhesion molecule (EP-CAM) in New Zealand Black (NZB) mice**. J Autoimmun.;13(4):393-404.
- Tandon AK, Clark GM, Chamness GC, McGuire WL. 1990. **Association of the 323/A3 surface glycoprotein with tumor characteristics and behavior in human breast cancer**. Cancer Res.;50(11):3317-21.
- Tchilian EZ, Beverley PC. 2006. **Altered CD45 expression and disease**. Trends Immunol.;27(3):146-53.
- Teshima T, Ordemann R, Reddy P, Gagin S, Liu C, Cooke KR, Ferrara JL. 2002. **Acute graft-versus-host disease does not require alloantigen expression on host epithelium**. Nat Med.;8(6):575-81.
- Thomas ED, Ramberg RE, Sale GE, Sparkes RS, Golde DW. 1976. **Direct evidence for a bone marrow origin of the alveolar macrophage in man**. Science.;192(4243):1016-8.
- Tichelli A, Gratwohl A. 2008. **Vascular endothelium as 'novel' target of graft-versus-host disease**. Best Pract Res Clin Haematol.;21(2):139-48
- Trzpis M, McLaughlin PMJ, de Leij LMFH, Harmsen MC. 2007. **Epithelial Cell Adhesion Molecule- More than a Carcinoma Marker and Adhesion Molecule**. Am J Pathol., 171:386-395.
- Tsubura A, Senzaki H, Sasaki M, Hilgers J, Morii S. 1992. **Immunohistochemical demonstration of breast-derived and/or carcinoma-associated glycoproteins in normal skin appendages and their tumors**. J Cutan Pathol.;19(1):73-9.
- Varga M, Obrist P, Schneeberger S, Mühlmann G, Felgel-Farnholz C, Fong D, Zitt M, Brunhuber T, Schäfer G, Gastl G, Spizzo G. 2004. **Overexpression of epithelial cell adhesion molecule antigen in gallbladder carcinoma is an independent marker for poor survival**. Clin Cancer Res.;10(9):3131-6.
- Vogelsang GB. 2008. **How I treat Chronic graft-versus-host disease**. Am Soc Hem.; 89(5):1196-1201.
- Went PT, Lugli A, Meier S, Bundi M, Mirlacher M, Sauter G, Dirnhofer S. 2004. **Frequent EpCam protein expression in human carcinomas**. Hum Pathol.;35(1):122-8.
- Went P, Vasei M, Bubendorf L, Terracciano L, Tornillo L, Riede U, Kononen J, Simon R, Sauter G, Baeuerle PA. 2006. **Frequent high-level expression of the immunotherapeutic target Ep-CAM in colon, stomach, prostate and lung cancers**. Br J Cancer.;94(1):128-35.
- Wilson J, Cullup H, Lourie R, Sheng Y, Palkova A, Radford KJ, Dickinson AM, Rice AM, Hart DN, Munster DJ. 2009. **Antibody to the dendritic cell surface activation antigen CD83 prevents acute graft-versus-host disease**. J Exp Med.;206(2):387-98.

Winter MJ, Nagtegaal ID, van Krieken JH, Litvinov SV. 2003a. **The epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) as a morphoregulatory molecule is a tool in surgical pathology.** Am J Pathol.,163(6):2139-48.

Winter MJ, Nagelkerken B, Mertens AE, Rees-Bakker HA, Briaire-de Bruijn IH, Litvinov SV. 2003b. **Expression of Ep-CAM shifts the state of cadherin-mediated adhesions from strong to weak.** Exp Cell Res.,285(1):50-8.

www.compucyte.com/images/lsc.jpg 10.11.2008

www.derma-net-online.com/buch/kapitel17_3/Kap_17_3_5.pdf, 10.02.2009

www.miltenyibiotec.com/en/PG_601_435_FcR_Blocking_Reagent_mouse_.aspx, 10.11.2008

www.miltenyibiotec.com/en/PG_320_68_CD326_EpCAM_MicroBeads.aspx, 10.11.2008

www.miltenyibiotec.com/en/PG_595_221_CD45.aspx, 10.11.2008

www.olympus.de/microscopy/22_scan_R.htm, 16.03.2009

Zaia J. 1990. **Viral infections associated with bone marrow transplantation.** Haematol Oncol Clin North Am. 4:603-623.

Zinkernagel RM, Doherty PC. 1979. **MHC-restricted cytotoxic T cells: studies on the biological role of polymorphic major transplantation antigens determining T-cell restriction-specificity, function, and responsiveness.** Adv Immunol.,27:51-177.

9 ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

Abb. 1: 3-Phasen-Modell der GvHD-Pathophysiologie	- 11 -
Abb. 2: Pathophysiologie der akuten GvHD	- 12 -
Abb. 3: Wirkmechanismen von Cyclosporin A (CSA), Tacrolimus (FK506) und Mycophenolat Mofetil (MMF) auf Lymphozyten	- 15 -
Abb. 4: Darstellung über Interaktionspartner von EpCAM und deren Bedeutung	- 19 -
Abb. 5: Laser Scanning Cytometer Apparatur	- 27 -
Abb. 6: Histogramm.	- 28 -
Abb. 7: Mikroskopauszug der fluoreszierenden Zellen mit 20facher Vergrößerung.	- 29 -
Abb. 8: EpCAM-positive Zellen unter dem Mikroskop mit 40facher Vergrößerung.	- 29 -
Abb. 9: Zellverlauf aller 35 Patienten in den ersten 12 Monaten	- 31 -
Abb. 10: Zellverlauf im Median über gesamten Zeitraum von sieben Jahren	- 31 -
Abb. 11: Boxplot über den Vergleich von EpCAM und dem Auftreten einer akuten Graft-versus-Host Disease (GvHD).	- 32 -
Abb. 12: Gegenüberstellung mittels eines Boxplots von zirkulierenden EpCAM-positiven Zellen und Ausprägung der akuten Graft-versus-Host Disease (GvHD).	- 33 -
Abb. 13: Gegenüberstellung von EpCAM-positiven Zellen/ml Blut und chronischer Graft-versus-Host Disease (GvHD).	- 34 -
Abb. 14: Gegenüberstellung von EpCAM-positiven Zellen und Immunsuppression (IS).	- 35 -
Abb. 15: Verläufe EpCAM-positiver Zellen bei den 4 betrachteten hämatologischen Krankheiten	- 36 -
Abb. 16: Patient BC, Beispielverlauf für die ALL ohne EpCAM-positive Zellen/ml Blut und kurzem Verlauf.	- 37 -
Abb. 17: Patient NY, Beispielverlauf für die ALL mit zackenförmigem Anstieg.	- 38 -
Abb. 18: Patient WT, Beispielverlauf für die AML.	- 39 -
Abb. 19: Patient BA, Beispielverlauf für das Myelom.	- 41 -
Abb. 20: Patient LG, Beispielverlauf für die CML ohne akute GvHD mit limitierter chronischer GvHD.	- 42 -
Abb. 21: Patient WA, Beispielverlauf für die CML ohne akute GvHD, mit extensiver chronischer GvHD und ECP.	- 43 -
Abb. 22: Patient KN, Beispielverlauf für die CML ohne chronische GvHD.	- 44 -
Abb. 23: Patient KE, Beispielverlauf für die CML mit akuter GvHD, limitierter chronischer GvHD und Rezidiv.	- 45 -
Abb. 24: Patient MH, Beispielverlauf für die CML mit akuter GvHD und limitierter chronischer GvHD.	- 46 -
Abb. 25: Patient GI, Beispielverlauf für die CML mit extensiver chronischer GvHD	- 47 -
Abb. 26: Zusammenfassung der Hypothesen	- 57 -
Abb. 27: Zusammenfassung des Verlaufes EpCAM-positiver Zellen unter Betrachtung des GvHD (Graft-versus-Host Disease) -Statuses, sowie den beiden Hypothesen über den Ursprung EpCAM-positiver Zellen.	- 59 -
Tab. 1: Zeitlicher Verlauf der immunologischen Rekonstitution nach allogener HSCT.	- 9 -
Tab. 2: Stadien- und Gradeinteilung der akuten GvHD nach Glucksberg.	- 13 -
Tab. 3: Kriterien der Seattle-Klassifikation für die Einteilung der chronischen GvHD in limited und extensive	- 14 -

10 ANHANG

Danksagung

Dr. med Lars-Olof Mügge möchte ich für die Vergabe des Themas, die Schaffung der angenehmen Arbeitsbedingungen, seine wissenschaftlichen Anregungen und für die nette Zusammenarbeit danken.

Außerdem möchte ich dem onkologischen Forschungslabor der Inneren Medizin II, besonders Prof. Dr. med Katharina Pachmann, für die Mitbetreuung, kritischen Anregungen und Diskussionen danken.

Paulin Wehrlich danke ich für die zahlreichen Korrekturen und hilfreichen Tipps.

Abschließend möchte ich allen Freunden besonders Felix Döhler, meiner Familie, meinem Mann und meinem kleinen Sohn für die Bereitschaft jederzeit ein offenes Ohr und unterstützende Worte bereit zu haben, ohne die es nie zu der Fertigstellung dieser Arbeit gekommen wäre.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist.

Ich habe die Dissertation selbst angefertigt und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben.

Die Hilfe eines Promotionsberaters wurde dabei nicht in Anspruch genommen es haben Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Ich habe diese Dissertation weder als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht, noch die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht.

Jena den

Sara Hilber

Lebenslauf**Persönliche Daten**

Name: Sara Hilber, geborene Kuhn
Geburtsdatum: 25. November 1983
Geburtsort: Plauen
Familienstand: verheiratet
Adresse: Bonhoefferstraße 2, 07747 Jena
Tel.-Nr.: 03641 801608
E-Mail: sara.hilber@gmx.de

Studium

Seit 09/2003 Studium der Humanmedizin, Friedrich-Schiller-Universität Jena
abgeschlossener Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Gesamtnote:
2,0)

Praktika/Berufserfahrung

03/ 2009 – 07/ 2009 **3. Tertial des Praktischen Jahres**
Innere Medizin, Abteilung für Hämatologie/Onkologie (FSU
Jena)
12/ 2008 – 03/ 2009 **2. Tertial des Praktischen Jahres**
Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie (FSU Jena)
08/ 2008 – 12/ 2008 **1. Tertial des Praktischen Jahres**
Anästhesie (FSU Jena)
seit 03/ 2006 **Promotion**
Korrelation zwischen Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion (GvHD)
nach allogener Blutstammzelltransplantation und zirkulierenden
EpCAM-positiven Zellen (Institut für Innere Medizin II, Abt. für
Hämatologie/ Onkologie Jena, Prof. Dr. K. Pachmann, OA Dr.
L.-O. Mügge)
02/ 2006 – 04/ 2007 **Famulaturen**
Innere Medizin V, Abteilung für Hämatologie/Onkologie
(Universitätsklinikum Heidelberg)
Innere Medizin (Kliniken Dr. M. Schreiber, München)
Allgemeinmedizin (Praxis Hilber/ Lukasczyk, Zwickau)

Schulbildung

09/ 2000 – 06/ 2003 Technisches Gymnasium am Beruflichen Schulzentrum
Werdau
09/1994 – 06/2000 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife (Gesamtnote 1,4)
Sahnschule Crimmitschau
Abschluss: Realschulabschluss (Gesamtnote 1,3)

Sonstige Kenntnisse

Sprachen Englisch, Schwedisch
EDV sicherer Umgang mit Bürosoftware (MS Office, MS Powerpoint
etc.)
Führerschein Klasse B

Jena, den 2010

ZUSAMMENFASSUNG

Die allogene Blutstammzelltransplantation (HSCT) ist ein potenziell kuratives Therapieverfahren bei malignen hämatologischen Erkrankungen. Eine zum Teil schwer behandelbare Nebenwirkung der allogenen HSCT ist die Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion (Graft-versus-Host Disease, GvHD). Die Pathomechanismen der GvHD sind nur teilweise verstanden.

Das Epitheliale Zelladhäsionsmolekül (EpCAM) ist ein Epithelzellmarker, welches Funktionen bei der Zelladhäsion, -migration und -differenzierung, -proliferation, dem Zellzyklus und -metabolismus, der Morphogenese, der Geweberegeneration sowie der Metastasierung übernimmt. Im gesunden Organismus sind EpCAM-positive Zellen nicht im peripheren Blut nachweisbar. Besondere Bedeutung haben zirkulierende EpCAM-positive Zellen als Marker für die Diagnose und zum Therapie-Monitoring von verschiedenen Karzinomen wie Kolon- und Mammakarzinom. Auf diesen Karzinomzellen wird EpCAM über- oder *de novo*-exprimiert. Weiterhin existieren Publikationen, die über eine aberrante EpCAM-Expression auf Plasmazellen berichten. Daneben konnten bei einzelnen Patienten mit entzündlichen Erkrankungen zirkulierende EpCAM-positive Zellen im Blut nachgewiesen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 35 Patienten nach allogener HSCT auf das Vorhandensein von im peripheren Blut zirkulierenden EpCAM-positiven Zellen untersucht. Hierzu wurden Verlaufsmessungen über einen Zeitraum von bis zu vier Jahren durchgeführt. Die Anzahl der EpCAM-positiven Zellen pro ml Blut wurde mittels Laser Scanning Cytometer (LSC) bestimmt. In der Krankenakte wurden bestimmte klinische Ereignisse, wie die Entwicklung der GvHD, entzündliche Prozesse, Operationen, immunsuppressive Therapie und andere Auffälligkeiten verfolgt, um diese dann mit dem zeitlichen Auftreten und dem quantitativen Verlauf der EpCAM-positiven Zellen korrelieren zu können.

Die hier gewonnenen Daten zeigen erstmalig, dass bei Patienten nach allogener HSCT mit einer Latenz von drei bis neun Monaten regelmäßig EpCAM-positive Zellen nachgewiesen werden können. Ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer akuten GvHD und EpCAM-positiver Zellen konnte nicht nachgewiesen werden. Im Falle des Auftretens einer chronischen GvHD wurden jedoch regelmäßig EpCAM-positive Zellen im Verlauf nachgewiesen, wobei sich die Zellzahlen indirekt proportional zum Schweregrad der GvHD verhalten. Des Weiteren können entzündliche Prozesse sowie operative Eingriffe den Verlauf der EpCAM-positiven Zellzahlen modulieren. Aus unseren Untersuchungen schließen wir, dass zirkulierende EpCAM-positive Zellen nicht zwingend Tumorzellen entsprechen müssen. Normale EpCAM-positive Zellen können durchaus in der Blutzirkulation existieren, ohne unverzüglich vom Immunsystem erfasst und zerstört zu werden. Dabei gibt es durchaus Anhaltspunkte, dass EpCAM zum einen auf Epithelzellen, aber auch auf hämatopoetischen Zellen exprimiert werden könnte.